

**Neuronale Regeneration im traumatisierten Sehnerven durch
Transplantation peripherer Nervensegmente -
Auswirkungen auf das retinale Proteinmuster und die
neuronale Vulnerabilität**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich

Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Erik Schütz

aus Marburg

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 29.04.2003
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Kuschinsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. S. Thanos

Tag der mündlichen Prüfung am 29.04.2003

Gewidmet den Möglichkeiten
der modernen Medizin
deren Fortschritt ich unendlich viel zu verdanken habe

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Ax	nach Axotomie
Ax+Tr	nach Axotomie und Ischiasnervtransplantation
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Di-Asp	4-(4-[Didecylamino]stryryl)-N-methylpyridiniumiodid
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Hsp27	<i>heat shock protein 27</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
INL	<i>inner nuclear layer</i>
IPG	<i>immobilized pH-gradient</i>
kD	Kilodalton
Ko	unbehandelt (Kontrolle)
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MGZ	Mikrogliazelle(n)
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
Ox-42	Klonnummer, entspr. Komplement 3- Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pl	isoelektrischer Punkt
PNS	peripheres Nervensystem
RGZ	retinale Ganglienzelle(n)
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Vorwort	1
1.2. Ursachen für das Regenerationsdefizit im ZNS	2
1.2.1. Extrinsische Faktoren (1): Gliale Einflüsse	2
1.2.2. Extrinsische Faktoren (2): Neurotrophische Einflüsse	5
1.2.3. Intrinsische Faktoren	6
1.3. Strategien zur Überwindung des Regenerationsdefizits im ZNS	7
1.3.1. Konzepte unter Beibehaltung der ZNS-Mikroumgebung	7
1.3.2. Konzepte unter Umgehung der ZNS-Mikroumgebung	8
1.4. Aufbau und Funktion der Retina	11
1.5. Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Chirurgische Methoden	13
2.1.1. Versuchstiere und Material	13
2.1.2. Operationen	14
2.1.2.1. Anästhesie, postoperative Versorgung und Tötung von Versuchstieren	14
2.1.2.2. Intrakardiale Perfusion von Versuchstieren	14
2.1.2.3. Axotomie des Sehnerven	15
2.1.2.4. Transplantation peripherer Nervensegmente	15
2.1.2.5. Retrograde Markierung von retinalen Ganglienzellen	19
2.1.3. Präparation der Retinae	21
2.2. Lichtmikroskopische Verfahren	22
2.2.1. Material	22
2.2.2. Immunhistochemie	24
2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie	25
2.2.3.1. Auswertung und Zellquantifizierung	25
2.3. Biochemische Methoden	26
2.3.1. Material	26
2.3.1.1. Chemikalien	26
2.3.1.2. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterial	27
2.3.2. Proteinbestimmung	28
2.3.3. Diskontinuierliche Gelelektrophorese	29
2.3.3.1. Lösungen	29
2.3.3.2. Gießen der Gele	30
2.3.3.3. Probenauftrag und Elektrophoresebedingungen	31
2.3.3.4. Fixierung und Färbung der Gele	32

2.3.4. <i>Western blot</i>	34
2.3.4.1. Proteintransfer	34
2.3.4.2. Detektion und immunologischer Nachweis	35
2.3.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese	37
2.3.5.1. Probenaufarbeitung	38
2.3.5.2. Probenauftrag und Rehydratation eines IPG-Strips	38
2.3.5.3. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	39
2.3.5.4. Gießen der Gele	39
2.3.5.5. Equilibrierung der fokussierten Proben	40
2.3.5.6. Kontinuierliche Gelelektrophorese (2. Dimension)	40
2.3.5.7. Fixierung und Färbung der Gele	41
2.3.5.8. MALDI-TOF-MS-Analyse	42
2.4. Statistik	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	43
3.1.1. Auswertung von Zone A	46
3.1.2. Auswertung von Zone B	48
3.1.3. Verifizierung von MALDI-Ergebnissen	49
3.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels eindimensionaler Gelelektrophorese	51
3.3. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels spezifischer Antikörper	53
3.3.1. Expressionsanalyse glialer Proteine	53
3.3.1.1. Immunhistochemie	53
3.3.1.2. <i>Western blot</i>	55
3.3.2. Expressionsanalyse von Hsp27	57
3.4. Untersuchung funktioneller regenerationspezifischer Veränderungen in RGZ durch neuroanatomische und immunchemische Techniken	60
3.4.1. Untersuchung der Vulnerabilität regenerierter RGZ nach Re-Axotomie	60
3.4.1.1. Re-Axotomie im Transplantat	60
3.4.1.2. Re-Axotomie im Sehnerven	64
3.4.2. Stabilisierung regenerierter RGZ durch Umleitung der Axone in periphere Innervationsgebiete	67
3.4.2.1. Immunhistochemische Analyse der neuromuskulären Übergangszone	67
3.4.2.2. Retrograde Markierung eingewachsener RGZ	71

3.4.3. Expressionsanalyse des Neurotransmitterenzym Cholinacetyltransferase	74
4. Diskussion	79
4.1. Biochemisch meßbare Veränderungen in retinalen Neuronen	80
4.1.1. Rolle von Hsp27	80
4.1.2. Rolle von β -Kristallin	82
4.2. Biochemisch meßbare Veränderungen in retinalen Gliazellen	84
4.2.1. Reaktion von Astroglia	84
4.2.2. Reaktion von Mikroglia	86
4.3. Ausbleibender Zelltod nach Re-Axotomie - eine „Peripherisierung“ zentraler Neurone?	87
4.4. Interaktion von regenerierenden RGZ-Axonon mit Skelettmuskulatur	90
4.5. Ausblick	92
5. Zusammenfassung	93
6. Literaturverzeichnis	95
7. Anhang	
7.1. MALDI-TOF-MS-Spektren	107
7.2. Trefferlisten	110
8. Danksagung	113
9. Publikationen	114
10. Lebenslauf	115

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Essentielle Eigenschaften des Nervensystems verändern sich irreversibel während und nach seiner Reifung. Dazu gehört zweifelsohne auch die Einstellung des axonalen Wachstums mit zunehmender Differenzierung und dem Erlangen kognitiver Leistungen. Als Folge davon wird die Fähigkeit des Nervensystems, zerstörte Zellen und durchtrennte Fasern zu ersetzen, eingestellt. Auf den ersten Blick ein Nachteil gegenüber anderen Organen, die regenerationsfähig bleiben. Die berechtigte Frage nach einem biologischen Sinn der fehlenden Regenerationsfähigkeit kann nur spekulativ angegangen werden.

Auf diese Weise führen neurodestruktive Einflüsse wie Trauma, Ischämie, Blutung, Intoxikation oder Infektion meist zu irreparablen funktionellen Einbußen wie Lähmungen, Erblindung, kognitive Störungen oder Demenz. Nun bedeuten aber gerade die funktionalen Ausfälle insbesondere des Zentralnervensystems (ZNS), wie z.B. solche bei M. Alzheimer oder Querschnittslähmungen, erhebliche finanzielle und soziale Belastungen für die Gesellschaft. Therapeutische Interventionen zum Ausgleich solcher neurologischen Defizite zielen insbesondere auf medikamentöse Neuroprotektion und den Zellersatz durch Implantation geeigneter Reparaturzellen in Läsionsstellen ab. Allerdings führten solche Ansätze in vielen Fällen bis jetzt nicht zu akzeptablen Ergebnissen und viele offene Fragen bezüglich der Mechanismen der neuronalen Degeneration im ZNS blieben weiterhin unbeantwortet.

Es ist allerdings bekannt, dass Faserverletzungen des peripheren Nervensystems (PNS), also außerhalb des Schädels und Rückenmarks, durch eine echte, strukturelle Regeneration kompensiert werden können. Dieses erneute axonale Wachstum wird meist auch mit einer funktionellen Restauration abgeschlossen. Eine weitere Strategie der neuronalen Reparatur besteht daher in der funktionellen Überbrückung zentral-nervöser Läsionen durch peripher-nervöse Bypässe. Der klinische Einsatz dieser Art der Nervenreparatur ist zwar auf sehr spezielle Fälle beschränkt, aber trotzdem von hohem wissenschaftlich-experimentellem Interesse. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb der Versuch unternommen werden, im Rahmen eines solchen Transplantationsparadigmas bislang unbekannte Aspekte der neuronalen Regeneration zutage zu fördern.

1.2. Ursachen für das Regenerationsdefizit im ZNS

Dem Regenerationsdefizit im ZNS von Säugetieren steht die Tatsache gegenüber, dass Neurone des Kaltblüter-ZNS wie z.B. von Amphibien und Fischen zeitlebens in der Lage sind, auf Verletzungen mit spontaner axonaler Regeneration und funktioneller Restauration zu reagieren (Sperry, 1944). Obwohl die Regenerationsfähigkeit innerhalb des Kaltblüter-ZNS regional unterschiedlich ist, so hat sie doch mehr Ähnlichkeit mit dem PNS von Säugetieren und Vögeln als mit deren ZNS. Der strukturelle Vergleich der zellulären Elemente im ZNS und PNS von Säugetieren brachte die Erkenntnis, dass die gliale Myelinisierung der Axone nur im PNS, nicht aber im ZNS von Schwann'schen Zellen durchgeführt wird (Cajal, 1928). In der Abwesenheit genau dieser Zellen im ZNS lag nach Cajal die hinreichende Erklärung für dessen Regenerationsdefizit. Mit dieser Formulierung bildete sich ein medizinisches Dogma, dessen Bruch Jahrzehnte auf sich warten ließ.

Erst in den 80iger Jahren konnte die Arbeitsgruppe um Aguayo zeigen, dass auch verletzte Neurone aus dem adulten Säuger-ZNS grundsätzlich in der Lage sind, zu regenerieren. Man demonstrierte am klassischen Modell von rückenmarkslädierten Ratten, dass durchtrennte Axone in ein Transplantat aus einem regenerationsfördernden peripheren Nerven einwachsen (David und Aguayo, 1981). Mit solch einem Transplantationsmodell, auf dessen wissenschaftlich-klinische Bedeutung später genauer eingegangen werden soll, wurden ZNS-Läsionen auch an anderen Stellen erfolgreich auf Regeneration getestet. So z.B. im olfaktorischen System (Friedmann und Aguayo, 1985) oder am Sehnerven (Vidal-Sanz et al., 1987). Diese Experimente waren insofern wegweisend als sie zeigen, dass die zum axonalen Wachstum notwendige molekulare Maschinerie der zentralen Neurone nicht eingestellt wird. Von daher schien ein wesentlicher Ansatz zur Lösung der Regenerationsfrage in der Untersuchung und Modulation der glialen Mikroumgebung zu liegen.

1.2.1. Extrinsische Faktoren (1): Gliale Einflüsse

Oligodendrocyten: Das von den Oligodendrocyten gebildete ZNS-Myelin übt bei Kontakt einen wachstumshemmenden Effekt auf Neuriten aus (Schwab und Caroni, 1988). Dies führte man auf myelinassoziierte inhibitorische Proteine zurück (McKerracher et al., 1996). Inzwischen wurden solche Komponenten identifiziert, und deren Expression konnte tatsächlich nur in Oligodendrocyten und nicht in den Schwann'schen Zellen des PNS nachgewiesen werden (Chen et al., 2000). Allerdings waren diese Proteine nicht myelengebunden, sondern fanden sich im endoplasmatischen Retikulum der

Oligodendrocyten wieder (Grand-Pre et al., 2000). Nichts desto trotz wurden gegen diese Komponenten Antikörper entwickelt, die *in vitro* die inhibitorischen Einflüsse des ZNS-Myelins wirklich neutralisieren konnten (Caroni und Schwab, 1988; Savio und Schwab, 1989). Allerdings war der Regenerationserfolg des Einsatzes dieser Antikörper am Modell von rückenmarksverletzten Ratten vergleichsweise unbefriedigender (Schnell und Schwab, 1990), so dass man davon ausgehen mußte, dass die inhibitorischen Einflüsse im ZNS eher multifaktoriell bedingt sind. Die Schwab'sche Hypothese kam erneut auf den Prüfstand, als Silver und Kollegen (1997) isolierte Wurzelganglionneurone in die weiße Gehirns substanz von adulten Ratten implantierten. Diese Neurone konnten über weite Strecken ihre Axone regenerieren, trotz der Konfrontation mit Oligodendrocyten. Man interpretierte diesen Befund dahingehend, dass die inhibitorischen Proteine nur bei Verletzungen von den Oligodendrocyten freigesetzt werden oder an deren Oberfläche gelangen, und dass solche Verletzungen durch das minimalinvasive Vorgehen weitestgehend verhindert wurden (Goldberg und Barres, 1998, für Übersicht).

Astrocyten: Wenn wie oben erwähnt die Oligodendrocyten nicht alleine für das Regenerationsdefizit im ZNS verantwortlich sind, so könnte Astrocyten eine Rolle dabei zukommen. Eine Verletzung im ZNS ist normalerweise mit einer lokalen Aktivierung von Astrocyten verbunden. Diese füllen letztlich die durch verlorengegangene Neurone entstandenen Hohlräume narbig aus und stellen so eine Wachstumsbarriere da (Gliose) (Graeber und Kreutzberg, 1988). Neben dieser „mechanisch“ bedingten Wachstumsinhibition wurde jedoch auch festgestellt, dass aktivierte Astrocyten im Verletzungsbereich bestimmte Moleküle der Extrazellulärmatrix hochregulieren wie z.B. Chondroitinsulfatproteoglykane. Für diese Glykoproteine konnten ebenfalls eindeutige inhibitorische Effekte auf wachsende Axone gezeigt werden (Canning et al., 1996). Damit ist jedoch die endgültige Rolle der Astrocyten in der neuronalen Regeneration im ZNS noch keinesfalls endgültig geklärt. Von Astrocyten ist ebenfalls bekannt, dass sie neben inhibitorischen Komponenten auch wachstumsfördernde Moleküle der Extrazellulärmatrix wie z.B. Laminin bilden können (Graeber und Kreutzberg, 1988). Zudem belegen Experimente mit Neuronen und Astrocyten in Kokultur, dass eine axonale Elongation durchaus mit der direkten Anwesenheit von astroglialen Zellen vereinbar ist (Ard et al., 1991). Die Rolle von Astrocyten wird noch diffiziler, wenn verletzte ZNS-Neurone zur Regeneration stimuliert werden. Ein solcher Einfluß des regenerationsfördernden PN-Gewebe auf Astrocyten und andere gliale Elemente des ZNS soll auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Mikrogliazellen: Ontogenetisch betrachtet sind diese Zellen als einzige im ZNS mesodermalen Ursprungs. Man geht heute davon aus, dass Promonocyten in frühembryonalen Entwicklungsstadien, in denen die Blut-Hirn-Schranke noch nicht etabliert war, auf hämatogenem Weg ins ZNS-Parenchym eingewandert sind und dann zur residenten Mikroglia wurden (Moore und Thanos, 1996, für Übersicht). Diese Zellen besitzen wesentliche Eigenschaften immunkompetenter Zellen wie z.B. Motilität und Phagozytoseaktivität. Sie können traumatisierte ZNS-Neurone als „verletzt“ erkennen und diese selektiv aus dem Gewebsgefüge eliminieren (Schnitzer und Scherer, 1990). Die aktive Rolle von Mikroglia am neuronalen Zelltod und deren Beziehung zu sterbenden Neuronen konnte besonders gut am Modell von fluoreszenzmarkierten axotomierten RGZ belegt werden (Thanos et al., 1994). Mikrogliale Aktivierung und Phagozytose erfolgt allerdings nicht nur beim traumatisch ausgelösten Zelltod, sondern auch bei erblich bedingter Neurodegeneration oder zur Entfernung überzähliger Neurone während der Embryonalentwicklung (Thanos, 1991; Moore und Thanos, 1996, für Übersicht). Aus den genannten Eigenschaften der Mikrogliazellen erwuchs die Idee, durch deren pharmakologische Unterdrückung mit dem neuronalen Zelltod zu intervenieren. So führte die intravitreale Injektion von *microglia-inhibiting factor* (MIF) nach Axotomie des Sehnerven zu einer starken Zunahme überlebender RGZ und regenerierender RGZ-Axone in ein peripheres Nerven-Transplantat (Thanos et al., 1993). Die Frage, ob Mikrogliazellen einen Unterschied machen zwischen axotomierten RGZ einerseits und regenerierten, aber erneut axotomierten RGZ andererseits ist bisher nicht angegangen worden und ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation.

Schwann'sche Zellen: Die myelinisierenden Zellen des PNS sind der einzige Gliotyp, deren Einfluß auf traumatisierte Neurone eindeutig überlebens- und auch wachstumsfördernd ist. Sie besitzen die Eigenschaften, sich nach Verletzung eines peripheren Nerven selbst wieder zu vermehren (Salzer und Bunge 1980) und für Neurone notwendige Zelladhäsionsmoleküle sowie Extrazellulärmatrixkomponenten zu synthetisieren (Terengi, 1995). Besonders wichtig für das erneute Wachstum der Axone ist die Produktion von neurotrophen Faktoren durch Schwann'sche Zellen (Bunge, 1994), auf deren Rolle im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden soll. Diese Charakteristiken der Schwann'schen Zellen führen letztlich zur erneuten Elongation und Myelinisierung des durchtrennten Neuriten sowie zur Resynaptogenese mit dem Zielgewebe (Terengi, 1995).

1.2.2. Extrinsische Faktoren (2): Neurotrophische Einflüsse

Eine entscheidende Rolle am neuronalen Schicksal wird den sog. Neurotrophinen zugesprochen. Dies sind peptidische Substanzen, die im allgemeinen an membranständige Tyrosinkinaserzeptoren von Neuronen binden und intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Die Folgen einer solchen Stimulation sind die Aufrechterhaltung eines wachstumsgerichteten Stoffwechsels einerseits (Terengi, 1995) und die Unterdrückung zur Apoptose führender Signalwege andererseits. Man geht davon aus, dass die Synthese dieser Faktoren in innervierten Zielgebieten stattfindet und sie über den axonalen Transport in die Zellkörper gelangen (Oppenheim, 1991). Bei einer Axotomie käme es somit zur Abkopplung der Neurone von deren trophischer Versorgung, welche maßgeblich verantwortlich für den retrograden Zelltod ist (Purves, 1988; Oppenheim, 1991). Im adulten PNS kann jedoch die trophische Stimulation nach einer Verletzung von den Schwann'schen Zellen ausgeglichen und der retrograde Zelltod somit verhindert werden (Bunge, 1994; Terengi, 1995).

Neueren Einschätzungen zufolge geht bei ZNS-Neuronen durch die Axotomie nicht nur die Verbindung zur Neurotrophinversorgung verloren, sondern auch die Responsivität auf diese Peptide (Golberg und Barres, 2000, für Übersicht). Dies wäre eine gute Erklärung dafür, dass die intravitreale Administration von Neurotrophinen wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) axotomierte RGZ nur vorübergehend am Leben hält (Mey und Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994). Es stellte sich weiter heraus, dass die verlorengegangene Responsivität verletzter ZNS-Neurone von deren elektrischer Aktivität und intrazellulären cAMP-Spiegeln abhängt (Meyer-Franke et al., 1998) und durch entsprechende pharmakologische Manipulationen wieder gesteigert werden kann (Shen et al., 1999).

Aus den genannten Gründen ist man sich einig, dass ein klinischer Einsatz von Neurotrophinen nur in Koadministration mit anderen Substanzen sinnvoll ist (Goldberg und Barres, 2000, für Übersicht). Zudem sind noch viele biopharmazeutische Fragestellungen offen wie z.B. Applikationsform, Dosierungsintervalle oder Schutz vor proteolytischem Abbau. Wesentlich praktikabler erscheint daher die Induktion solcher Neurotrophine durch Pharmaka, z.B. im Falle einer ischämischen neuronalen Schädigung (Culmsee et al., 1999).

1.2.3. Intrinsische Faktoren

Unter intrinsischen Faktoren werden intrazelluläre Signalwege, deren molekulare Komponenten sowie deren Regulation verstanden, welche die Entscheidung über Tod oder Überleben eines Neurons kontrollieren. In molekularer Hinsicht besteht der Regenerationsvorgang aus der Assemblierung spezifischer Proteine und Lipide sowie deren anaboler Verwendung, der ein geordnetes Ein- oder Umschalten bestimmter genetischer Elemente vorausgeht. Eine bestimmte Art des neuronalen Zelltods ist ebenfalls durch eine hierarchische, molekulare Kontrolle gekennzeichnet und wird als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet. Der apoptotische Zelltod lässt sich von der Nekrose durch molekulare und morphologische Charakteristika abgrenzen, z.B. Induzierbarkeit durch bestimmte Agenzien, Zellfragmentierung, Phagozytose durch benachbarte Zellen und Ausbleiben einer Inflammation (Cohen et al., 1992).

Wichtige Regulatoren der Apoptose sind Proteine der Bcl-2-Familie, von der sowohl proapoptische als auch antiapoptische Mitglieder bekannt sind. Die Kontrolle der Apoptose hängt von deren jeweiligem relativen Vorkommen in der Zelle ab (Merry und Korsmeyer, 1997). Wie zuvor angedeutet, führt die Stimulation einer Nervenzelle durch Neurotrophine zu einer intrazellulären Phosphorylierungskaskade, bei der proapoptische Bcl-2-Mitglieder deaktiviert und der Zelltod somit verhindert wird (Datta et al., 1999, für Übersicht). Bei Ausbleiben trophischer Stimuli oder Einfluß toxischer Faktoren wird die apoptotische Maschinerie der Zelle zugunsten der Apoptose umbalanciert. In deren weiteren Verlauf kommt es dann zur Beteiligung einer Gruppe von Cysteinproteasen (Caspasen), deren Aktivierung letztlich zur Fragmentierung der Zelle führt (Nunez et al., 1999, für Übersicht).

Aus den genannten Punkten ergeben sich pharmakologische Interventionsmöglichkeiten. So kann der programmierte Zelltod durch Überexpression von Bcl-2 (Martinou et al., 1994) oder durch Inhibition der Caspasen (Nunez et al., 1999, für Übersicht) zumindest stark verzögert werden. Es spricht vieles dafür, dass es sich beim retrograden Zelltod von axotomierten RGZ ebenfalls um eine Apoptose handelt. So zeigen beispielsweise Bcl-2-überexprimierende Mäuse einen stark retardierten Ganglienzelltod (Chierzi et al., 1998). Weitere Indizien sind die Zelltodverzögerung durch Verabreichung von Caspaseinhibitoren (Kermer et al., 1999) und nicht zuletzt die Phagozytose der axotomierten RGZ durch Mikrogliazellen.

An dieser Stelle muß erwähnt werden, dass das Überleben eines Neurons zwar notwendig, aber noch nicht unbedingt hinreichend für dessen axonale Regeneration ist. So überleben isolierte, Bcl-2-überexprimierende RGZ zwar längere Zeit in Kultur, zeigen axonales Wachstum aber erst in Anwesenheit von Neurotrophinen oder durch elektrische Aktivität (Goldberg et al., 2002). Deswegen wundert es nicht, dass die Regenerationsrate von RGZ in ein Ischiasnervtransplantat bei Bcl-2-überexprimierenden Mäusen gegenüber dem Wildtyp kaum verändert ist (Inoue et al., 2002).

1.3. Strategien zur Überwindung des Regenerationsdefizits im ZNS

1.3.1. Konzepte unter Beibehaltung der ZNS-Mikroumgebung

Stimulierte Leukocyten: Die Verletzung und Regeneration eines peripheren Nerven ist - wie bei anderen Geweben auch - durch die Invasion und aktive Beteiligung von hämatogenen Immunzellen gekennzeichnet. Diese inflammatorischen Zellen haben jedoch bei einer ZNS-Verletzung aufgrund der Blut-Hirn-Schranke normalerweise keinen Zutritt. Man glaubte deshalb, dass aufgrund unzureichender inflammatorischer Reaktionen Läsionen im ZNS nicht heilbar seien (Schwartz and Moalem, 2001, für Übersicht). Ein experimenteller Ansatz bestand somit in der *in vitro*-Sensibilisierung von Makrophagen gegen peripheres Nervengewebe und deren Implantation an die ZNS-Läsionsstelle. Am Modell des verletzten Sehnerven bei der Ratte konnte daraufhin gezeigt werden, dass einige RGZ-Axone die Verletzungstelle passieren und in der weißen Substanz des Sehnerven weiterwachsen konnten (Lazarov-Spiegler et al., 1998). Es ist allerdings zu überlegen, ob solch ein Therapieansatz nicht in einer Autoimmunerkrankung wie Multipler Sklerose ausarten kann.

Kataraktogene Linsenverletzung: Dieser Ansatz beruht auf der Auslösung einer traumatischen Katarakt, die auf axotomierte RGZ eine starke neuroprotektive und neuritogene Wirkung ausübt. Auch in diesem Fall wurde eine Faserregeneration im Sehnerven beobachtet, die innerhalb der ursprünglichen Bahn sogar bis hin zu ehemaligen Zielgebieten erfolgte (Fischer et al., 2001). Einige Autoren führen diese Effekte auf die Freisetzung intralentaler Faktoren zurück (Fischer et al., 2000), während andere eine intraokuläre Folgeinflammation mit Leukocyteninfiltration der Retina dafür verantwortlich machen (Leon et al., 2000). Ungeachtet des wahren Mechanismus belegen diese Experimente eindeutig, dass axonales Wachstum in der weißen Substanz durchaus möglich ist und es vielmehr geeigneter Stimuli bedarf, um die Neurone in eine Regenerationsbereitschaft zu versetzen.

Implantation von Reparaturzellen: Neben der Restauration direkter neuronaler Verbindungen ergibt sich nicht weniger selten die Notwendigkeit, Zellgruppen oder Neurotransmitter zu ersetzen. Das Konzept des Zelltransfers in Läsionsstellen bietet sich vor allem zur Sanierung verlorengegangener neuronaler Netzwerke an, wie sie bei neurodegenerativen Modellen wie M. Parkinson auftreten. Eine erfolgreiche klinische Anwendung hat bereits seit einigen Jahren die Implantation dopaminergischer fötaler Neurone im Bereich der Basalganglien bei Parkinson-Patienten gefunden. Die mangelhafte dopaminerge Neurotransmission im motorischen System der behandelten Patienten konnte so positiv beeinflusst werden, und die Verbesserung der klinischen Symptomatik hält in vielen Fällen schon seit 10 Jahren an (Barinoga, 2000). Über einen Einsatz von pluripotenten Zellen aus frühembryonalen Stadien bei solchen Erkrankungen wird ebenfalls seit einigen Jahren diskutiert.

1.3.2. Konzepte unter Umgehung der ZNS-Mikroumgebung

Periphere Nervenretransplantation: Eine sinnvolle und nicht weniger erfolgsversprechende Strategie zum Ausgleich neuronaler Defizite ist die Überbrückung der inhibitorischen ZNS-Umgebung durch Transplantate aus dem PNS. Wie bereits angedeutet gehört dieses regenerative Konzept zu den ältesten Strategien und ist bis heute funktionell und cytologisch am besten untersucht worden. Eine Reihe bedeutsamer Arbeiten sind vor allem durch den Einsatz solcher Transplantationen im visuellen System entstanden.

Auf diesem Weg der echten Bypasschirurgie ist es in der Ratte, aber auch in der Katze, gelungen, die visuelle Bahn nach kompletter Durchtrennung des Sehnerven mithilfe eines peripheren Nervensegmentes zu überbrücken (Watanabe et al., 1991; Heiduschka und Thanos, 2000, für Übersicht). Die so regenerierenden RGZ wurden morphologisch und funktionell charakterisiert. RGZ unterschiedlicher morphologischer Typen tragen proportional zum Nachwachsen ihrer Axone in das Transplantat bei. Dies konnte dadurch bewiesen werden, dass durch retrograde Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen die Heterogenität der regenerierten RGZ-Population sichtbar gemacht wurde (Thanos und Mey, 1995). Zusätzlich weiß man aus einer Reihe von Transplantationen, dass hier eine Myelinisierung der Ganglienzellaxone durch Schwann'sche Zellen stattfindet, die mit dem Myelinisierungsmuster des PNS identisch ist (Vergl. Abb. 1) (Watanabe et al., 1994). Schließlich führt die Rekonnektion der regenerierenden Neurone mit zentralen visuellen Arealen zur erneuten Aufnahme synaptischer Kontakte, die morphologisch und funktionell systemtypisch sind und langzeitstabilisiert werden (Carter et al., 1991). Diese regenerativen Vorgänge ermöglichen sowohl die Restauration des Pupillokonstriktions-

Reflexes (Thanos,1992), das Ableiten visuell evozierter Potentiale aus dem Cortex als auch eine einfache visuelle Perzeption (Thanos et al., 1997).

Auf funktioneller Ebene wird für diese Leistungen eine Reexpression von wegfindungsrelevanten Molekülen wie in der Embryogenese erforderlich. Diese führen wachsende Axone in die Zielgebiete und sorgen innerhalb derer für eine sinnvolle Anordnung (Thanos und Mey, 2001, für Übersicht). Es ist allerdings nicht bekannt, inwiefern die beschriebene Regeneration des visuellen Systems den Vorgängen der Embryogenese ähnelt. Fest steht nur, dass für eine sinnvolle Restauration von Systemen mit komplexer Topographie das Wachstum regenerierender Axone nicht zu chaotisch sein darf.

Eine Transplantation peripherer Nervensegmente zur Reparatur der verletzten visuellen Bahn beim Menschen, z.B. nach Schädel-Hirn-Trauma, ist derzeit nicht möglich. Das liegt zum einen am schwierigen chirurgischen Zugang und zum anderen an der Tatsache, dass beim Menschen die retinale Vaskularisierung im Sehnerven organisiert ist und bei bulbunaher Durchtrennung somit zerstört würde. Der klinische Einsatz der peripheren Nerventransplantation beschränkt sich bisher auf bestimmte Fälle von Rückenmarksverletzungen, um v.a. ausgefallene Funktionen der oberen Extremitäten wiederherzustellen. Über solche chirurgisch durchgeführten Ersatzinnervationen berichten in jüngerer Zeit einige Autoren mit beachtlichem Erfolg. So wurde beispielsweise der noch funktionsfähige Zwerchfellnerv (Xu et al., 2002) oder Brustmuskelnerv (Samardzic et al., 2002) in geeigneten Patienten unilateral mobilisiert und mit geeigneten Armmuskulaturversorgenden Nerven anastomosiert. Durch diese Verfahren wurde in der Mehrzahl der Fälle eine Restauration der Ellbogenflexion bzw. Armabduktion möglich, ohne dass die Ursprungsfunktionen der benutzten Donornerven wesentlich gestört war.

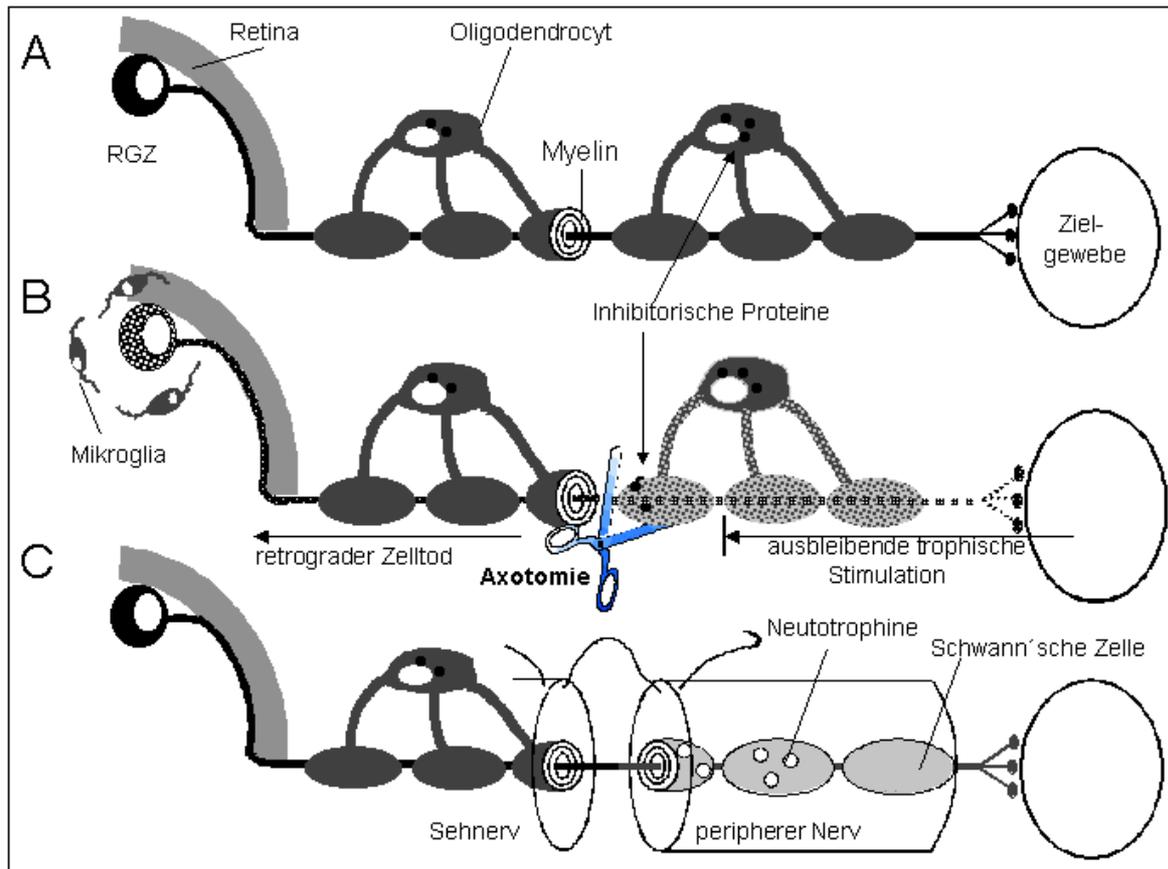


Abb. 1 Schematische Zusammenfassung neurophysiologischer Grundlagen

A. Eine RGZ innerviert über das retinofugale Axon ihr Zielgebiet im Mittelhirn. Die axonale Myelinisierung erfolgt in zentralen Nerven typischerweise durch Oligodendroglia. B. Bei einer axonalen Verletzung wird angenommen, dass ansonsten im Cytoplasma ansässige Inhibitoren an die gliale Oberfläche gelangen und so ein Weiterwachsen der Axone blockieren. Zudem wird durch die Diskonnektion vom Zielgebiet die Versorgung des Neurons mit trophischen Faktoren unterbrochen. Somit drohen der RGZ der Zelltod und mikrogliale Phagozytose innerhalb weniger Tage. C. Eine axonale Regeneration ist innerhalb eines peripheren Nervensegmentes bishin zur Resynaptogenese im Zielgebiet möglich. Die neurotrophe Versorgung und axonale Myelinisierung erfolgt dann durch Schwann'sche Zellen.

1.4. Aufbau und Funktion der Retina

Im Bezug auf neuronales Regenerationsvermögen und Art der Gliazellen erfüllt die Retina typische Eigenschaften des ZNS. Sie wird als vorgelagerter Teil des Gehirns betrachtet. Da sie zentrales Objekt der biochemischen, histochemischen und cytologischen Untersuchungen dieser Dissertation ist, soll ihre Anatomie und Physiologie anhand einer Grafik kurz dargestellt werden (Rohen, 1994, für Übersicht), (Vergl. Abb. 2).

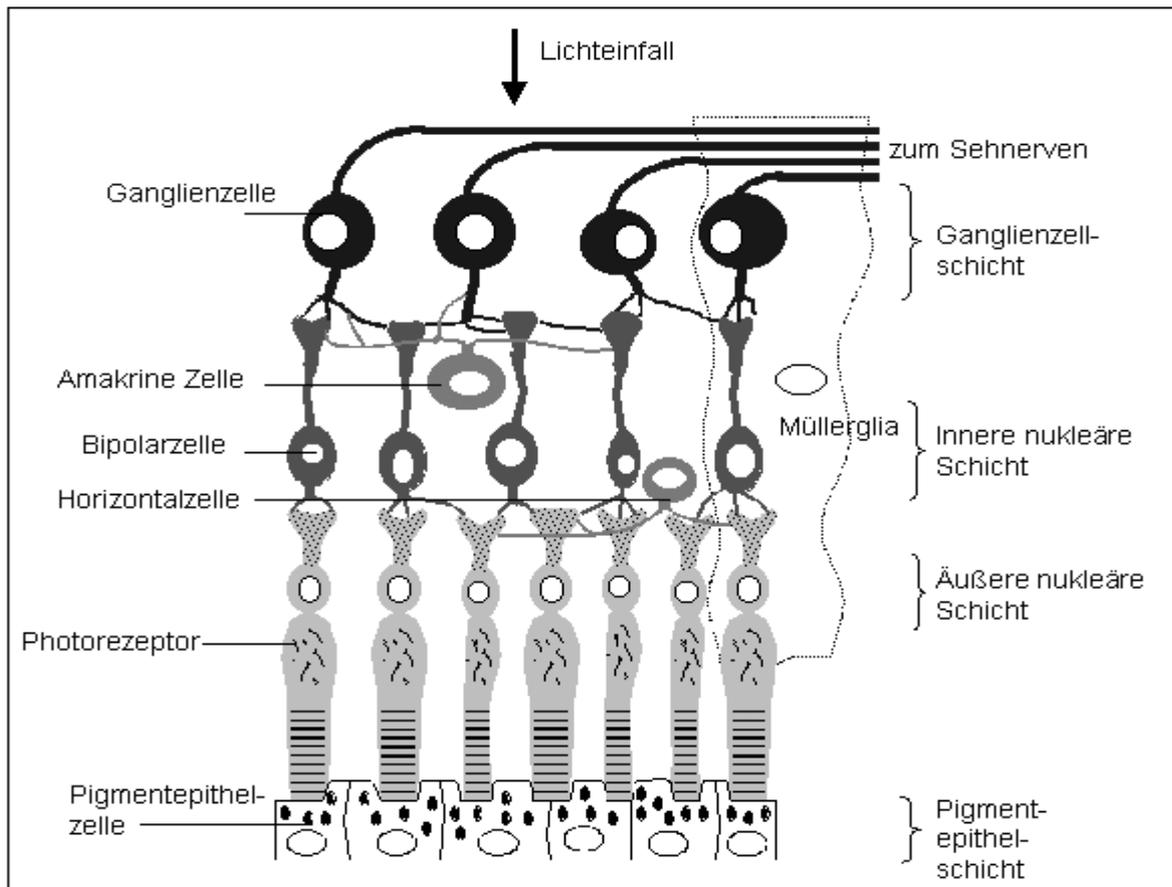


Abb. 2 Aufbau und Funktion der Retina

Das Licht tritt von der Ganglienzellschicht her ein und wird von den Photorezeptoren in elektrische Signale umgewandelt. Das Signal wird über Bipolarzellen der inneren nukleären Schicht zu den Ganglienzellen weitergeleitet, deren Axone den Sehnerv bilden. Eine Modulation der Signalweiterleitung geschieht durch amakrine oder Horizontalzellen, die in den synaptischen Zonen eine intensive Quervernetzung der Neurone bilden. Zwischen den neuronalen Zellen befinden sich Müllerzellen (Astroglia), deren Ausläufer die gesamte neurale Retina durchspannen. Diese Zellen entsprechen Radialgliazellen im Gehirn und erfüllen beispielsweise Aufgaben der Gewebstabilisierung und zellulären Homöostase. Dem Pigmentepithel kommen vor allem Funktionen beim Recycling des Sehpigments Rhodopsin zu.

1.5. Ziele der Arbeit

Der Ersatz des durchtrennten Sehnerven durch ein peripheres Nerventransplantat ist mittlerweile ein fest etabliertes Modell in der Regenerationsforschung. In vielen Fällen diente es der Messung der neuritogenen Potenz von Pharmaka, die intravitreal appliziert wurden und ggf. zu einer Zunahme der einwachsenden RGZ-Axone führten. Das Modell lieferte auch relevante funktionelle Daten, z.B. nach Rekonnektion regenerierender Axone mit zentralen visuellen Arealen. Relativ wenig Beachtung fanden bisher biochemische Auswirkungen der Transplantation auf das visuelle System, insbesondere auf die Retina. Diese Aspekte sind jedoch ebenso mit dem axonalen Wachstum der RGZ verbunden und somit auch regenerationsrelevant. Folglich soll in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob A) der peripher-nervöse Sehnerversatz biochemisch meßbare, regenerationsspezifische Änderungen in der Retina auslöst und B) inwieweit regenerierende RGZ dadurch selbst peripher-nervöse Eigenschaften annehmen.

Es wurden folgende experimentelle Ziele angestrebt:

- 1.) Identifizierung regenerationsrelevanter Proteine im visuellen System der Ratte durch Proteinmustervergleich von regenerierten Retinae mit solchen nach Axotomie des Sehnerven und solchen ohne Behandlung
- 2.) Aufzeigen eines regenerationsrelevanten Kontext für bereits bekannte Proteine durch Vergleich des Expressionsmusters innerhalb obiger Gruppen mithilfe spezifischer Antikörper
- 3.) Vulnerabilitätsvergleich von normalen und regenerierten RGZ bezüglich axonaler Verletzung und Phagocytose durch Mikrogliazellen mithilfe neuroanatomischer Färbetechniken
- 4.) Stabilisierung regenerierender RGZ durch Umleitung der Axone in ein peripher-nervöses Zielgewebe (quergestreifte Muskulatur) und Erfassung eventueller Neurotransmitteränderungen mithilfe neuroanatomischer und immunchemischer Techniken

2. Material und Methoden

2.1. Chirurgische Methoden

2.1.1. Versuchstiere und Material

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Albinoratten des Sprague-Dawley Stammes (*Rattus Norvegicus*) mit einem Gewicht von 180 bis 220 g, die entweder selbst gezüchtet wurden oder von der Firma Charles River bezogen wurden. Die Haltung erfolgte paarweise oder zu dritt bei Raumtemperatur (18-20 °C) unter natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus in üblichen Zuchtbehältern (Makrolonkäfig, Typ III). Die Ernährung erfolgte durch eine *ad libitum* Diät aus Standard Alleinfutter und Leitungswasser. Alle genehmigungspflichtigen Versuche sind mit Zulassung des Regierungspräsidiums (Versuchsnummern A49/99; G73/99) durchgeführt worden und über die Operationen wurde gemäß § 9a (1) des Tierschutzgesetzes Protokoll geführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 86 Ratten benötigt, deren Verteilung sich wie folgt aufschlüsselt:

Gewinnung von Gewebe für 1 bzw. 2-D-Gelelektrophorese:	20 Tiere
Gewinnung von Gewebe für Immunhistochemie, SDS-PAGE und <i>Western blot</i> :	18 Tiere
Gewinnung von Gewebe für neuroanatomisch-cytologische Analyse:	
Überleben re-axotomierter regenerierter RGZ <i>in vivo</i>	22 Tiere
Überleben axotomierter normaler RGZ <i>in vivo</i>	12 Tiere
Langzeitstabilisierung von RGZ durch Umleitung in periphere Zielgewebe	14 Tiere

Die für die chirurgischen Eingriffe benötigten Instrumente (feine Pinzetten, chirurgische Pinzetten, Mikro-, Kapsel-, Präparationsscheren, Faden- und Skalpellhalter mit spitzen und stumpfen Klingen, Knochenzange) stammten von den Firmen Aesculap, Martin (beide Tuttlingen) und Storz. Tupfer von der Größe 2-5 mm wurden selbst zugeschnitten. Die Operationen wurden an einem Zeiss Operationsmikroskop (OMI 19-FC) bei 4- bis 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Außerdem standen ein Handstaubsauger und ein handelsüblicher Rasierapparat zur Verfügung.

2.1.2. Operationen

2.1.2.1. Anästhesie, postoperative Versorgung und Tötung von Versuchstieren

Vor jedem operativen Eingriff wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von 2 mg Xylazin (Xylazin 2%, Sanofi) und 12,5 mg Ketamin (Ketanest 10%, Sanofi) pro 100 g Körpergewicht betäubt. Nach Erreichen des Narkosestadiums, das am Erlöschen des Lidreflexes sichergestellt werden konnte, wurde vor allen Eingriffen die Kopfhaut der Tiere rasiert. Bei der Durchführung der Ischiasnervtransplantation (s.u.) wurden zusätzlich die Haare am rechte Oberschenkel entfernt. Die Fixierung der Tiere am Operationstisch erfolgte mit Hilfe einer Maulklemme und Klebestreifen, mit denen die Extremitäten befestigt wurden.

Unter den oben beschriebenen Bedingungen hielt die Narkose für ca. 1,5 h an. Um eine bakterielle Infektion der Hautnähte und ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern, wurde beides postoperativ mit antibiotikahaltiger Salbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) versorgt und die Tiere in einen Käfig mit frischer Streu überführt. Einige Stunden nach dem jeweiligen Eingriff und auch in den darauffolgenden Tagen wurde durch postoperative Kontrollen sichergestellt, dass alle Tiere die Anästhesie überwunden hatten, keine Verhaltensauffälligkeiten zeigten, die auf Schmerzen hätten hindeuten können, und dass sich die Hautnähte in einwandfreiem Zustand befanden. Die Tötung der Tiere geschah schmerzlos in CO₂-Atmosphäre.

2.1.2.2. Intrakardiale Perfusion von Versuchstieren

Die intrakardiale Perfusion diente der Gewinnung von anämischem und fixierten Gewebe für immunhistochemische und neuroanatomische Untersuchungen. Hierfür wurden die Tiere anästhesiert, rückwärts auf eine Kunststoffplatte gelegt und daran mit den gespreizten Extremitäten fixiert. Die Eröffnung der Thoraxhöhle erfolgte mit einer starken Schere zunächst unterhalb des Sternums und wurde dann U-förmig in kranialer Richtung fortgesetzt. Das ausgeschnittene Segment Thoraxwand wurde mobilisiert, aufgeklappt und in kranialer Richtung mit Klemmen fixiert. Ventrikel und Vorhof des linken Herzen wurden entlang der Herzachse eingeschnitten, der Schlauchaufsatz der Perfusionspumpe bis in den Aortenbogen vorgeschoben und mit einer Klemme an Ventrikelresten fixiert. Darauf wurde der Vorhof des rechten Herzen eingeschnitten, um einen schnelleren Austritt der Perfusionsflüssigkeit zu gewährleisten. Die Perfusion mit PBS erfolgte so lange, bis Pfoten und Nase weiß erschienen und wurde dann mit dem ungefähr gleichen Volumen PFA wiederholt.

2.1.2.3. Axotomie (Durchtrennung) des Sehnerven

Die Axotomie des Sehnerven diente als traumatischer Auslöser für den retrograden Zelltod der RGZ. Dessen Auswirkungen wurden einerseits bei der biochemischen Untersuchung retinaler Proteine und andererseits beim Vulnerabilitätsvergleich zwischen normalen und regenerierten RGZ untersucht. Bei allen Versuchen wurde dieser Eingriff nur am linken Auge durchgeführt, so dass die Tiere nie beidseitig erblindeten.

Die Kopfhaut der Ratten wurde mit dem Skalpell durch einen 2 cm langen sagittalen Schnitt entlang der Medianlinie aufgetrennt und vorsichtig vom Schädel losgelöst, so dass der linke Kopfhautlappen mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über das linke Auge hinweggespannt werden konnte. Ein weiterer Schnitt entlang des *Os frontale* durch das Bindegewebe oberhalb des Augapfels eröffnete den Zugang zur Orbita bei minimaler Verletzung kleinerer Blutgefäße. Eine partielle Resektion der Tränendrüse ermöglichte das Auffinden des Sehnerven im retrobulbären Raum. Desweiteren mussten die oberen extraokulären Muskeln durchtrennt werden. An deren am Augapfel verbliebenen Enden wurde ein Haltefaden angebracht (7.0, Ethicon), das Auge daran vorsichtig nach unten gezogen und fixiert. Anschließend wurden die Meningen mit einer kleinen Schere längs zum Sehnerven aufgetrennt, so dass der freie Sehnerv vortrat. Dieser konnte nun mit einer Schere ca. 1 mm vom Bulbus vollständig durchtrennt werden, so dass der distale und proximale Teil etwas auseinanderdrifteten.

Bei der Sehnervaxotomie durfte die *Arteria centralis*, die bei Nagern innerhalb der Meningen verläuft, nicht beschädigt werden, da dies zu einer ischämischen Schädigung der Retina mit Nekrose geführt hätte. Die Integrität der retinalen Gefäße wurde im Anschluß an den Eingriff funduskopisch durch eine Aplanation der Cornea überprüft. Dazu wurde die Hornhaut mit Augentropfen benetzt und der Augenhintergrund durch andrücken eines Objektträgers an die Cornea betrachtet. Eine Verletzung der *Arteria centralis* konnte bei einer guten Durchblutung der retinalen Gefäße ausgeschlossen werden. Die Entnahme der Retinae nach Ganglienzelldegeneration für biochemische und histochemische Zwecke erfolgte nach 14 Tagen.

2.1.2.4. Transplantation peripherer Nervensegmente

Um traumatisierten RGZ *in vivo* eine axonale Regeneration zu ermöglichen, wurde der distale Teil des Sehnerven nach Axotomie durch ein Ischiasnervsegment ersetzt.

Die Entnahme eines Ischiasnervsegmentes wurde immer autolog durchgeführt, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Nach den beschriebenen Operationsvorbereitungen wurde die Haut einseitig entlang des rechten Oberschenkels eingeschnitten und das

Operationsfeld durch zwei an den Wundrändern fixierten Haltefäden offengehalten. Ein interfascialer Schnitt entlang der der Oberschenkelmuskulatur eröffnete den Zugang zum Ischiasnerven, der anschließend dargestellt und von Bindegewebe gesäubert wurde. Ein ca. 2 cm langes Stück wurde herausgeschnitten und in eine Petrischale mit PBS überführt. Nachdem die Muskulatur wieder in ihre ursprüngliche Lage überführt und mit einem resorbierbaren Faden (7.0, Ethicon) zusammengenäht worden war, konnte der Hautschnitt durch eine fortlaufende Naht (4.0, Ethicon) verschlossen werden.

Die Orbitotomie sowie die Auffindung, Darstellung und Axotomie des Sehnerven erfolgte wie unter 2.1.2.3. beschrieben. Als nächstes konnte nun das Epineurium des zuvor entnommenen Ischiasnervsegmentes durch 3 Nähte (10.0, Ethicon) mit Duraresten des *Opticus*stumpfes verbunden werden, so dass auf diese Weise eine echte Sehnerv-Ischiasnerv-Anastomose hergestellt wurde. Das Transplantat wurde blind endend in einen 1 bis 2 mm breiten Knochenkanal gelegt, der zuvor parasagittal mit einem Zahnarztbohrer in den Schädel gefräßt worden war. Zur Stabilisierung der Anastomose wurde um diese herum ein Polster aus *Gelfoam* gelegt und die Kopfhaut durch eine Naht verschlossen. Die Entnahme der Retinae nach Ganglienzellregeneration für biochemische und histochemische Zwecke erfolgte ebenfalls nach 14 Tagen.

Für Versuche der Lanzeitstabilisierung von RGZ sollten die regenerierenden Axone in periphere Zielgebiete umgeleitet werden. Hierfür wurde eine gleichzeitige Rekonnektion des distalen Teils des Transplantates mit der Kaumuskulatur gewählt, da dieser aufgrund seiner topologischen Nähe zum Auge geeignet wär. Die Operation wurde wie oben beschrieben durchgeführt, nur dass der Knochenkanal nicht gerade, sondern im Bogen mit einem Ausgang zum Kaumuskel in den Schädel gefräßt wurde. Oberflächliche sehnige Anteile des Muskels wurden auf einer breite von ca. 6-7 mm bis zum Erscheinen des rotes Muskelgewebes reseziert, bis ein geeignetes Bett zur Aufnahme des Transplantatendes entstanden war. Die neuroanatomisch-histologische Untersuchung dieser neuromuskulären Übergangszone erfolgte 8 Wochen nach der Transplantation.

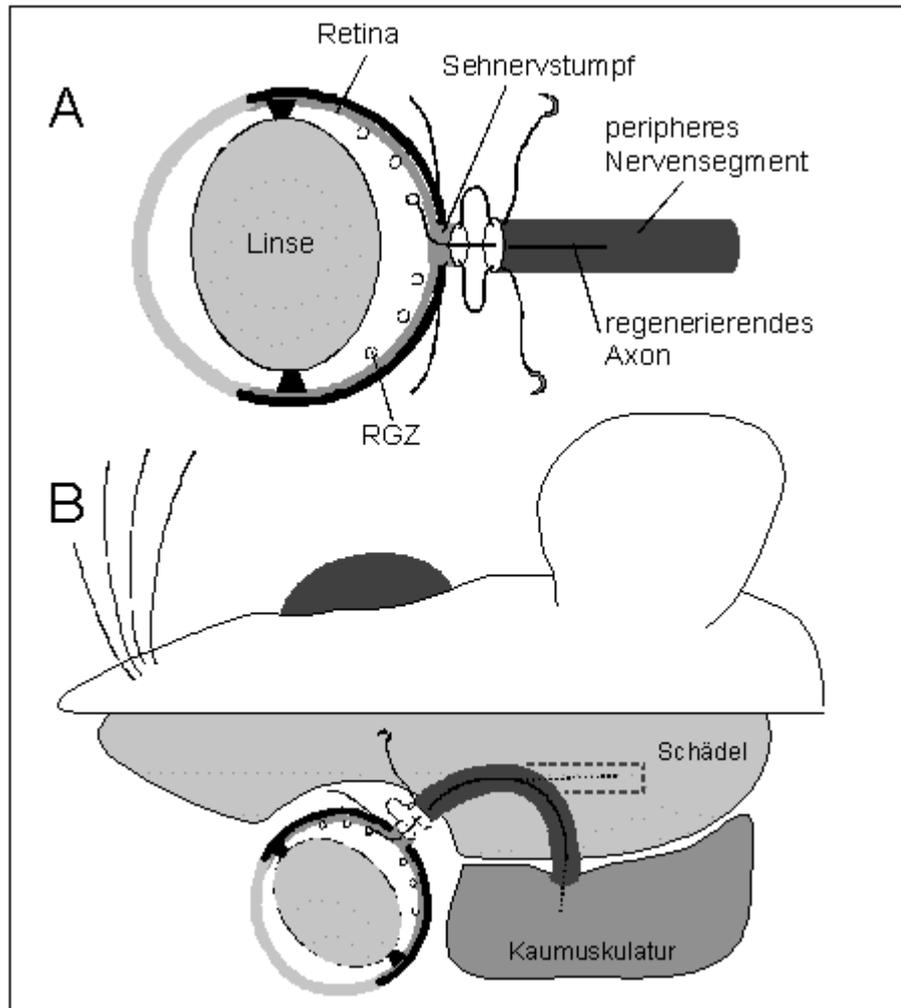


Abb. 3 Schematische Darstellungen des Transplantationsparadigmas

A. Der distale Teil des durchtrennten Sehnerven wird durch ein peripheres Nervensegment ersetzt und Ganglienzellaxonen so eine axonale Regeneration ermöglicht. B. Aufsicht auf den Rattenschädel. Der distale Teil des Transplantates verbleibt entweder blind endend im Schädel (gestrichelte Linie) oder wird für Langzeituntersuchungen mit Zielgeweben, hier der Kaumuskulatur, verbunden.

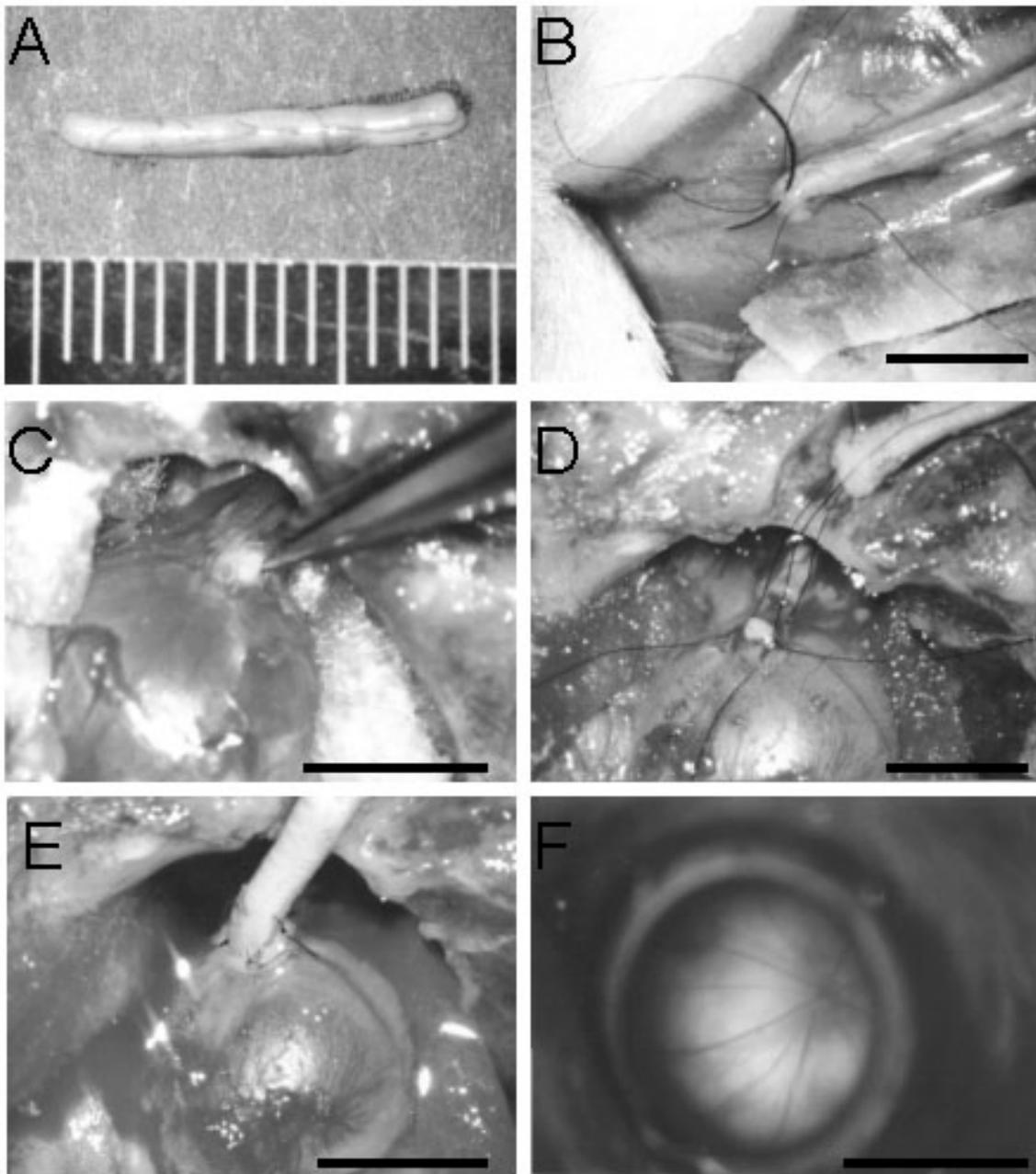


Abb. 4 Chirurgische Schritte

A. Autologes Ischiasnervsegment von ca. 12 mm Länge nach der Entnahme. B. Präparation des Transplantates mit je drei 10.0er Fäden. C. Chirurgische Darstellung und Axotomie des Sehnerven. D. Annäherung des preparierten Ischias-Segmentes an den durchtrennten Sehnerven. E. Fertiggestellte Opticus-Ischias-Anastomose. F. Fundoskopische Kontrolle der retinalen Vaskularisierung. Maßstäbe alle 5 mm.

2.1.2.5. Retrograde Markierung von retinalen Ganglienzellen

Um das neuronale Überleben von RGZ nach Axotomie mit dem von regenerierten RGZ nach ihrer erneuten Axotomie untersuchen und vergleichen zu können, war es erforderlich, die jeweiligen Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe anzufärben.

Die Markierung von nativen RGZ erfolgte direkt nach intraorbitaler Axotomie des Sehnerven (s. 2.1.3.1.). Es wurden nun winzige Kristalle des Fluoreszenzfarbstoffes N-4-(4-[Didecylamino]stryryl)-N-methylpyridiniumiodid (4-10-Di-Asp, Molecular Probes) oder alternativ 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI, Molecular Probes) auf dem Sehnervstumpf plaziert, mit Freund'schem Adjuvans benetzt und mit *Gelfoam* in Position gehalten. Der Hautschnitt wurde wie gehabt verschlossen. Über den axonalen Transport kam es nun zu einer intensiven Anfärbung von RGZ, deren Überleben nach 4, 7, 14 und 28 Tagen quantifiziert wurde.

Für die Re-Axotomie und Markierung von regenerierten RGZ wurden Ratten verwendet, bei denen 14 Tage zuvor die beschriebene Ischiasnervtransplantation durchgeführt worden war. Während dieser Zeit waren die Ganglienzellaxone in ausreichender Länge in das Transplantat eingewachsen. Es wurden hierzu die transplantierten Ratten nochmals betäubt, das Transplantat im Verlauf des Knochenkanals freigelegt und an der Orbitakante (ca. 3 - 4 mm von der Anastomose) durchtrennt. Die Farbstoffkristalle wurden an die Schnittstelle gelegt, ebenfalls benetzt und mit *Gelfoam* fixiert. Abschließend erfolgte wieder die Hautnaht. Das neuronale Überleben der regenerierten RGZ, die bei diesem Eingriff re-axotomiert worden sind, wurde analog zu den nativen RGZ nach 4, 7, 14 und 28 bestimmt.

Eine weitere Art der retrograden Markierung wurde bei RGZ durchgeführt, dessen Axone zwecks Langzeitstabilisierung in die Kaumuskulatur umgeleitet worden waren. Die betreffenden Tiere wurden acht Wochen nach der Transplantation reanästhesiert und die neuromuskuläre Verbindungsstelle freigelegt. Mit einem spitzen Skalpell (Nr. 11) wurden feine Stichinzisionen in den Muskel 1-2 mm unterhalb der Transplantateinmündungsstelle gesetzt. Kleine Di-Asp-Kristalle wurden in die entstandenen Kavitäten gedrückt und mit etwas benetztem *Gelfoam* fixiert. Der Hautverschluß erfolgte wie oben erwähnt. Die Quantifizierung der RGZ mit ins Muskelgewebe regenerierten Axonen erfolgte 7 Tage nach der retrograden Markierung.

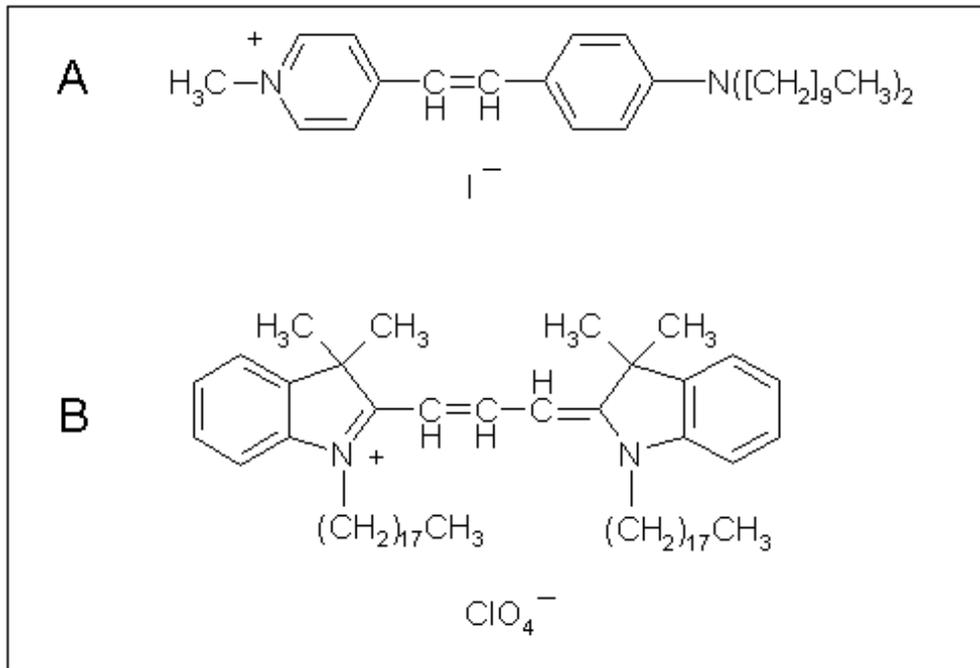


Abb. 5 Fluoreszenzfarbstoffe als neuroanatomische *Tracer*

Das Pyridiniumderivat Di-Asp (A) sowie das Carbocyanin Dil (B) können zur retrograden Markierung von Neuronen verwendet werden. Dazu werden winzige Farbstoffkristalle an Nervenstümpfen oder in Terminationsgebieten plziert, was über den axonalen Transport eine intensive Fluoreszenz der Neurone zur Folge hat. Bei Phagocytose von absterbenden Neuronen durch immunkompetente Zellen, z.B. nach Axotomie, geht der Farbstoff in diese über (transzelluläre Färbung).

2.1.3. Präparation der Retinae

Nach Tötung der Ratten und Eukleation der Augen wurden diese in eine Petrischale mit eisgekühltem PBS überführt. Unter Betrachtung mit einer Stereolupe wurden zunächst verbliebene Gewebsreste mit einer Kapselschere vom Augapfel abgetrennt. Dann erfolgte ein Skalpelleinstich in den Limbus, der als Ansatzpunkt für einen zirkumferentiellen Schnitt diente, bei dem der vordere Teil des Auges mit Cornea, Iris und Linse entfernt werden konnte. Es folgten 4 radiale Einschnitte in die verbliebene hintere Augenkammer im Winkel von 90 °, die dann die schrittweise Separation der Retina von der Sklera mit feinen Pinzetten ermöglichte. Danach wurde die halbkugelförmige Retina auf einer Nitrocellulosemembran mit der Ganglienzellschicht nach oben kleeblattförmig ausgebreitet und an den Rändern leicht angetackert. Auf der Nitrocellulosemembran liegend wurde die Retina nun auf ein weißes Filterpapier überführt und so die Flüssigkeit nach unten weggesaugt, ohne dass das Gewebe ganz trocken wurde. Dies diente der besseren Haftung der Netzhaut auf dem Nitrocellulosefilter. Reste des noch auf der Retina haftenden Glaskörpers wurden anschließend mit feinen Pinzetten entfernt.

Retinae, die markierte RGZ enthielten und für Quantifizierungen vorgesehen waren, wurden mitsamt Nitrocellulosemembran in eine Petrischale mit Fixiermittel (4%iges PFA in PBS) transferiert. In diesem Medium verblieben die ausgebreiteten Retinae mindestens 2 h, bevor sie auf Objektträgern in Mowiol eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden.

Retinae für biochemische Untersuchungen wurden am Ende von den Nitrocellulosefiltern wieder abgezogen, auf den Boden von Eppendorfcups überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Um Retinagewebe für immunhistochemische Färbungen zu gewinnen, wurden bereits die enukleierten Augen in eine vorgefertigte kleine Form positioniert, mit *Tissue Tek* übergossen und die gesamte Form dann ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus diesen gefrorenen Blocks wurden dann mit Hilfe eines Kryostaten Querschnitte des Auges hergestellt.

2.2. Lichtmikroskopische Verfahren

2.2.1. Material

Einbettungsmedium für Kryostatschnitte: Tissue Tek (Sakura)

Objekträger: (Engelbrecht)

Blockierlösung: Fötale Kälberserum (10 % FCS) (Seromed)

Eindeckelmedium: Mowiol 4-88 (Hoechst)

Zwölf Gramm Mowiol wurden zunächst in 30 g fluoreszenzfreiem Glycerol unter intensivem Rühren gelöst und danach 30 ml destilliertes Wasser zugegeben. Unter leichtem Rühren wurde der entstandenen Suspension weitere 60 ml einer 0,2 M Tris/HCl-Puffer-Lösung pH 8,5 hinzugefügt wurden. Die Flüssigkeit wurde bei 56 °C für 10 min leicht gerührt und unlösliche Bestandteile bei 5000 g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei – 20 °C aufbewahrt (für die Immunhistochemie von Cryostatschnitten erfolgte der Zusatz von 5 µg/ml DAPI [Sigma] zur Zellkernfärbung).

Erstantikörper (alle IgG):

Anti-GFAP, monoklonal, Quelle: Maus	(Sigma)
Verdünnung: 1:50	
Anti Bcl-2, monoklonal, Quelle: Maus	(Sigma)
Verdünnung: 1:50	
Anti-Complement 3-Rezeptor (Ox-42), polykl., Qu.: Maus	(Serotec)
Verdünnung: 1:50	
Anti-Hsp27, polyklonal, Quelle: Kaninchen	(Upstate)
Verdünnung: 1:50	
Anti-Cholinacetyltransferase, polyklonal, Quelle: Ziege	(Chemicon)
Verdünnung: 1:50	
Anti-Neurofilament, monoklonal, Quelle: Maus	(Sigma)
Verdünnung: 1:50	

Zweitantikörper (alle IgG):

Anti-Maus gekoppelt mit Cy-2, Quelle: Ziege	(Dianova)
Verdünnung: 1:50	
Anti-Kaninchen gekoppelt mit TRITC, Quelle: Ziege	(Sigma)

Verdünnung: 1:50
 Anti-Kaninchen gekoppelt mit Cy-2, Quelle: Ziege (Dianova)
 Verdünnung: 1:50
 Anti-Ziege gekoppelt mit Cy-3, Quelle: Esel (Sigma)
 Verdünnung: 1:50
 Anti-Ziege gekoppelt mit FITC (Serotec)
 Verdünnung: 1:50

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

NaCl	9 g	
Na ₂ HPO ₄	2,4 g	
KH ₂ PO ₄	0,27g	(alle Merck)
Aquadest	ad 1000ml	

(Angleichung des pH-Wertes mit 0,1 M HCl oder NaOH)

Fixierlösung:

Paraformaldehyd (PFA)	40 g
PBS	ad 1000ml

Geräte und sonstige Materialien:

Präparations-Stereomikroskop (Zeiss): STEMI SR

Kaltlichtquelle (Schrott): KL 1500-Z

Kryostat (Reichert-Jung): 2800 Frigocut E

Axiophot (Zeiss): Fluoreszenzmikroskop mit Epifluoreszenzeinrichtung mit Fluoreszenzfiltern 450 bis 490 nm, 510 bis 560 nm und 395 bis 440 nm, HBO 50 W Quecksilberhochdrucklampe

Kamerasystem und Bildanalysesoftware: Axiovision (Zeiss)

Präparationsbesteck:

Feine Pinzetten, spitze und runde Skalpellklingen (Nr. 10, Nr. 11), Skalpellhalter, Kapselschere (Storz)

Verbrauchsmaterial:

Nitrocellulosefilter (Sartorius): schwarz, Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm

Filterpapier (Whatman): weiss

Petrischalen (Greiner): Durchmesser 35 mm

2.2.2. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie basiert auf der spezifischen Bindung eines unmarkierten Antikörpers an Membranantigenen oder an anderen Proteinen des Gewebes. Durch einen Zweitantikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und seinerseits spezifisch an den Erstantikörper bindet, kann das Membranantigen bzw. Protein unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Alle Färbungen dieser Art wurden an Kryostatschnitten nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Fixierung der Schnitte in -20°C kaltem Methanol (Merck) für 10 min *
2. Waschen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS pH 7,4
3. Blocken der Schnitte mit FCS (10 %) für 30 min und Entfernen der Blockierlösung* durch tippen der Objektträger auf Filterpapier am Ende des Schrittes
4. Waschen für 1 x 5 min in PBS pH 7,4
5. Pipettieren der Erstantikörperlösung* auf die Schnitte und Inkubation über Nacht bei 4°C in einem wasserdampfgesättigten Gefäß
6. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in PBS pH 7,4
7. Pipettieren der Zweitantikörperlösung* auf die Schnitte und Inkubation in einem wasserdampfgesättigten Gefäß für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit
8. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in PBS pH 7,4
9. Eindeckeln der Schnitte in Mowiol (mit $5\ \mu\text{g/ml}$ DAPI-Zusatz)
10. Betrachtung, Auswertung und Dokumentation unter dem Fluoreszenzmikroskop mithilfe des zugehörigen Bildanalyse-systems
11. Lagerung der Schnitte bei -20°C und bei Dunkelheit

Bei den Negativkontrollen wurde bei sonst identischer Verfahrensweise anstelle der Erstantikörperlösung PBS auf die Schnitte pipettiert.

*) Bei Immunhistochemie an retinalen Ganzpräparaten (*whole-mounts*) wurde auf Schritt 1 verzichtet und den Blockier- und Antikörperlösungen 0,1 % Triton X-100 zugesetzt. Blockier- und Antikörperlösungen bestanden in diesem Fall aus PBS mit 2 % BSA.

2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

2.2.3.1. Auswertung und Zellquantifizierung von Retinae nach retrograder Ganglienzellmarkierung

Für die Betrachtung der mit Di-Asp angereicherten RGZ und Mikrogliazellen eignete sich der FITC-Filter des Mikroskops. Zellzählungen wurden üblicherweise mit einem Okulargitternetz mit dem 40 x Objektiv (400-fache Endvergrößerung) durchgeführt. Die Resultate der Zellzahlbestimmung pro Ausschnitt, die sich entlang einer gedachten Linie vom Zentrum der Retina aus hin zur Peripherie erstreckten und die Retina in fünf imaginäre Zonen konzentrisch um die Papille unterteilten, wurden für jede Retina gemittelt und als Zelldichte in Form von Zellen/mm² berechnet.

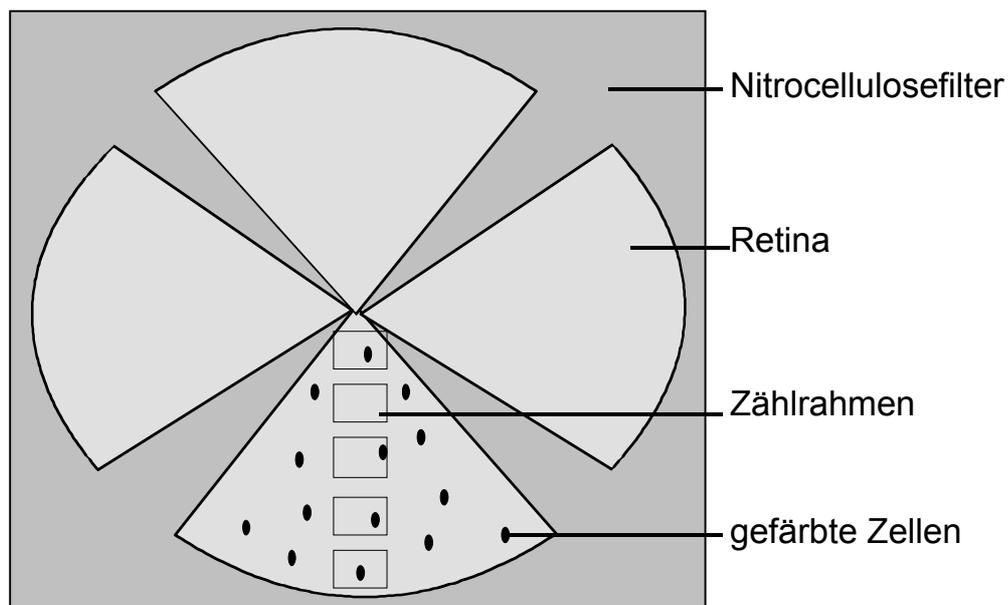


Abb. 6 Schematische Darstellung der Quantifizierung der retrograd markierten RGZ bzw. transzellulär gefärbten Mikrogliazellen in retinalen Ganzpräparaten (*whole-mounts*).

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Material

2.3.1.1. Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid)	Roth
Agarose	Merck
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
Ammoniumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol, p.A.	Roth
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenol-sulphophtalein)	Sigma
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]1-propansulfat)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G 250	Merck
Dry Strip Cover Fluid	Amersham
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
DTT (Dithiothreitol)	Roche
ECL ("Enhanced Chemoluminescence")	Amersham
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma
Essigsäure (96%)	Roth
Ethanol (absol.)	Merck
Formaldehydlösung (37%)	Sigma
Glycerin (87%)	Roth
Harnstoff, ultra pure	Merck
Iodoacetamid	Sigma
Isobutylalkohol (2-Methyl-1-propanol)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Magermilchpulver für die Molekularbiologie	Merck
Methanol	Roth
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck
Natriumdihydrogensulfat-Dihydrat	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Pharmalyte	Amersham
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Phosphorsäure 85%	Merck
Rainbow-Marker (250-10 kDa)	Sigma
Rinderserum-Albumin (BSA), Standart für Proteinbestimmung	Sigma

Saccharose	Merck
SDS (sodiumdodecylsulfate, = Natriumlaurylsulfat)	Sigma
Silbernitrat	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Fluka

2.3.1.2. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterial

Geräte und Zubehör:

Gelgießstand für Polyacrylamid-Flachgele und Zubehör: 7 Sets Glasscheiben, Spacer 1 mm, Trennscheiben aus Plexiglas, Probenkämme (Fa. Hanischmacher)

Gelgießstand für Polyacrylamid-Flachgele und Zubehör: Kunststoffgehäuse, 8 Glasgelkassetten, Kunststoffspacer und Gelkasettendummies (Ettan Dalt Six, Gel Caster; Amersham)

Elektrophoreseapparatur für Gele mit folgenden Maßen: Höhe 100 mm, Breite 85 mm, Tiefe 1 und 0,5 mm (Fa. Hanischmacher)

Elektrophoreseapparatur für Gele mit folgenden Maßen: 18 x 16 x 1 mm (H x B x T; Fa. Hanischmacher)

Apparatur zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinproben in immobilisierten pH-Gradienten (IPG) und Zubehör: Multiphor II, Dry Strip Tray, Dry Strip Aligner und Papierelektroden (Amersham)

Elektrophoreseapparatur für Gele mit folgenden Maßen: 200 x 255 x 1 mm (H x B x T), (Ettan Dalt Six Elektrophoresis Unit; Amersham)

Stromversorgung: Power Pac 3000 (Bio Rad) und EPS 3501 XL (Amersham)

pH-Elektrode: pH Meter (Beckmann)

Tischzentrifuge: 5415 C (Eppendorf, Beschleunigung bis 14 U/min)

Große Zentrifuge: 6K15 (Sigma)

Photometer: Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech)

Schüttler (Vibrax VXR, IKA)

Röntgenfilmentwicklungsmaschine: Curix 60 (Agfa)

Blockthermostat: BT 200 (Kleinfeld)

Ultraschallhomogenisator: UW 70 (Bandelin)

Kühlung (Omnilab, National Lab)

Reswelling Tray (Amersham)

Sonstige laborübliche Geräte: Freiwaage, Vortexgerät, Heizplatten mit Magnetrührer, Spritzen und Kanülen sowie ein Abzug

Verbrauchsmaterial:

Nitrocellulosemembran (Protan BA 83; Schleicher & Schnell), Whatman 3 MM Filter (Whatman Maidstone), Röntgenfilme (Curix HC 1000G; Agfa), IPG-Strips (pH 4-7, Länge 18 cm; Amersham)

2.3.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung erfolgte nach Bradford (1976). Die Proteinbestimmung basiert auf der selektiven Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine, wobei das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Da der Extinktionskoeffizient über einen weiteren Konzentrationsbereich konstant bleibt, können die Proteinkonzentrationen bei geeigneter Probenverdünnung und unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch gemessen werden.

Bradford-Reagenz: Coomassie Brilliant Blue G 250 (0,01 %)
 Phosphorsäure (8,5 %)
 Ethanol (4,7 %)

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden definierte Mengen BSA (2, 4, 6, 8, 10 µg) in 0,1 ml Wasser gelöst und anschließend 1 ml Bradford-Reagenz hinzugegeben. Die kurz gevortexte Lösung wurde nach 2 min in 2 ml-Küvetten überführt und darauf die Absorption bei 595 nm gegenüber einem Nullwert gemessen. Die ermittelten Absorptionswerte wurden gegen entsprechende Proteinmengen abgetragen, so dass durch diese eine Ausgleichsgerade gelegt werden konnte, die zugleich die Standardkurve darstellte. Um die Proteinmenge in einer Lösung zu bestimmen, wurde ein bestimmtes Volumen mit Aqua dest. auf 0,1 ml aufgefüllt und wie oben beschrieben mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Die bei 595 nm gemessenen Absorptionswerte liessen sich anhand der Standardkurve einer entsprechenden Referenzmenge BSA zuordnen.

2.3.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ist ein geeignetes Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen. Die Proteine werden zuvor durch Hitze und die Anwesenheit von SDS denaturiert. Eventuell vorhandene Disulfidbrücken werden durch Mercaptoethanol im Probenpuffer gespalten. Bei der SDS-PAGE wandert der negativ geladene SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zur Anode, wobei der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit ihrem Molekulargewicht auftrennt (Laemmli, 1970). Das Verfahren fand in der vorliegenden Arbeit Anwendung zur Auftrennung für *Western blot* und die Kontrolle von Molekulargewichten.

2.3.3.1. Lösungen

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 SDS (0,4 %)
 NaN₃ (0,02 %)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 SDS (0,4 %)
 NaN₃ (0,02 %)

Laufpuffer (10-fach): 250 mM Tris
 1,92 M Glycin
 SDS (0,1 %)
 NaN₃ (0,02 %)

Die hier genannten Pufferlösungen wurden nach der Herstellung filtriert und max. 8 Monate bei 4 °C aufbewahrt.

Starten der Polymerisierungsreaktion:

 TEMED
 APS (20 %, aliquotiert bei -20 °C)

Probenpuffer: Tris/HCl, pH 6,8 (130 mM)
 SDS (10 %)
 Mercaptoethanol (10 %)

	Bromphenolblau (0,06 %)
	Glycerin (20 %)
Lysepuffer:	Tris/HCl, pH 7,5 (20 mM)
	EDTA (0,1 mM)
	Mercaptoethanol (0,1 %)
	Saccharose (300 mM)
	PMSF (0,1 mM; jeweils frisch zugesetzt)
	Triton (1%)

Proben- und Lysepuffer wurden in 1,5 ml-Aliquots aufgeteilt und bei – 20 °C aufbewahrt.

2.3.3.2. Gießen der Gele

Für die *Western blots* wurden ausschließlich Gele mit 12 % Dichte (entsprechend des Acrylamidanteils) angefertigt, da sich hiermit ein breites Spektrum an Molekulargewichten auftrennen ließ. Zumeist wurden fünf Gele gleichzeitig gegossen. Hierzu wurden die Glasplatten der Flachgele in Form von Sandwichs (Glasplatte mit Ausparung/2 Spacer/Glasplatte ohne Ausparung) pro Gel im Gießstand aufgebaut. Dieser wurde anschliessend mit Plexiglasplatten plan aufgefüllt und durch eine weitere Kunststoffplatte von außen mithilfe von Klammern abgedichtet. Danach konnte unter Verwendung der oben angegebenen Stammlösungen mit dem Gießen der Trenngele begonnen werden. Die angegebenen Mengen sind für fünf Gele der Abmessung 85 x 100 x 1 mm (L x B x T) zugrunde gelegt.

Benötigte Lösungsmengen für fünf 12 %ige (Trenn-)Gele:

Trenngelpuffer:	15 ml
Acrylamid-Stammlösung:	24 ml
Aqua dest.:	21 ml

Zum Polymerisieren wurden 100 µl TEMED und 100 µl APS (20 %) zugesetzt, verrührt und dann relativ schnell in den Gelgießstand gefüllt, wobei 3 cm für das Sammelgel bis zum oberen Glasplattenrand frei bleiben mussten. Direkt danach wurde jedes Gel mit ca. 0,5 ml Isopropanol oder Isobutylalkohol überschichtet. Nach einer Stunde war der Polymerisationsvorgang abgeschlossen, so dass nach Entfernung der

Überschichtungsflüssigkeit und Abspülen mit Aqua dest. mit dem Gießen des Sammelgels begonnen werden konnte.

Benötigte Lösungsmengen für fünf Sammelgele:

Sammelgelpuffer:	10 ml
Acrylamid-Stammlösung:	6 ml
Aqua dest.:	24 ml

Das Auspolymerisieren des Sammelgels wurde durch Zugabe von 60 ml TEMED und 120 ml APS (20 %) initiiert. Sodann wurde die Sammelgelflüssigkeit auf die Trenngele verteilt und die Teflonkämme eingesetzt, wobei der Einschluß von Luftblasen zwischen den Taschen zu vermeiden war. Die Polymerisation des Sammelgels war nach ca. 30 min bei Raumtemperatur abgeschlossen, so dass die fertigen Gele aus dem Gießstand entnommen und danach in Haushaltsfolie eingepackt werden konnten. Bei Lagerung in einer mit Wasserdampf gesättigten Plastiksachtel bei 4 °C konnten diese bis zu 2 Wochen gelagert werden.

2.3.3.3. Probenaufarbeitung und Elektrophoresebedingungen

Eine Retina wurde in 100 µl Lysepuffer aufgemommen, mechanisch vorzerkleinert und dann durch Sonifizierung solubilisiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung der Proteinlösungen erfolgten wie unter 2.3.2. beschrieben. Die Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und der innere und untere Tank mit je 150 ml frisch hergestelltem Laufpuffer aufgefüllt. Danach konnten die Kämme vorsichtig aus dem Sammelgel herausgezogen werden. Die in den Probenpuffer aufgenommen Proteinlösungen (Verdünnung 1 + 3) wurden im Thermoblock für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend kurz gevortext. 20 oder 15 ml der so aufgearbeiteten Probe wurden mittels einer Pipette in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese konnte anschließend durch Anlegen einer Spannung von zunächst 100 V gestartet werden. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde diese auf 200 V erhöht. Kurz bevor die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

2.3.3.4. Fixierung und Färbung der Gele

Coomassie-Färbung

Die Coomassiefärbung beruht auf einer selektiven Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine.

Coomassie-Färbelösung: Coomassie Brilliant Blue G 250 (0,2 %)
 Essigsäure (10 %)
 Methanol (50 %)

Diese Lösung, die gleichzeitig auch fixierend wirkt, wurde nach der Herstellung filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Entfärbelösung: Essigsäure (7,5 %)
 Ethanol (30 %)

Die Gele verblieben unter leichter Agitation für 20 min im Färbebad. Danach wurde diese zur Wiederverwendung abgesaugt, Lösungsreste kurz mit Wasser weggespült und letztlich die Entfärbelösung zugegeben. Es dauerte i.d.R. 24 h, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar und die Hintergrundfärbung weitestgehend verschwunden war. Bis zur photographischen Dokumentation konnten die Gele in Wasser mit etwas Essigsäure bei 4 °C aufbewahrt werden.

Silberfärbung:

Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Reduktionsmittel wie $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ reduzieren Ag^+ -Ionen zu elementarem Ag^0 , welches sich entsprechend niederschlägt und die Proteinbanden folglich sichtbar macht.

Lösungen:

Fixiermittel: Methanol (50 %)
 Essigsäure (12 %)

Waschlösung: Ethanol (30 %)

Imprägnierlösung:	Aqua dest. (150 ml) Formaldehyd 35 % (100 µl) Na ₂ S ₂ O ₃ 43 % (75 µl)
Silberinkubationslösung:	AgNO ₃ 10% (150 ml) Formaldehyd 35 % (100 µl) (lichtgeschützt aufzubewahren)
Reduktionslösung:	Na ₂ CO ₃ 60 % (250 ml) Formaldehyd 35 % (125 µl) Na ₂ S ₂ O ₃ 43 % (2,5 µl)
Reduktionsstopplösung:	Essigsäure 7 %

Färbeprozedur:

1. Fixierung: 3 x 20 min in 200 ml Fixierlösung
2. Waschen mit Ethanol 30 %: 3 x 5 min
3. Imprägnierlösung: 45 sec unter kräftigem Schwenken
4. Waschen mit Aqua dest.: 3 x 1 min
5. Inkubation mit Silberlösung: 20 min
6. Kurzes Waschen mit Aqua dest.: 15 sec
7. Reduktion: zunächst nur 50 ml Reduktionslösung zugeben, kurz schwenken und ausgefälltes AgCO₃ schnell abgießen, danach Entwicklung mit restlicher Lösung
8. Sobald Banden gut entwickelt, mit Aqua dest. spülen
9. Stoppen der Reduktion mit Essigsäure 7 %
10. Kurz waschen mit Aqua dest.: 5 min
11. Lagerung in Ethanol 30 % bei 4°C

2.3.4. Western blot

2.3.4.1. Proteintransfer

Beim *Western blot* werden Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf die Oberfläche einer Membran übertragen. Dadurch werden sie für Antikörper zugänglich und folglich immunologisch detektierbar. In der vorliegenden Arbeit wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch das Tankblottingverfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde folgender Transferpuffer verwendet:

Tris 25 mM
Glycin 192 mM
Methanol (20 %)

Sowohl das Gel als auch die auf die entsprechende Größe zurechtgeschnittenen Whatmanpapierstücke und Nitrocellulosemembran wurden zunächst für 10 min in Transferpuffer getränkt. Danach musste ein Sandwich in der Reihenfolge Schwammtuch, Whatmanpapier, Membran, Gel, Whatmanpapier und Schwammtuch assembliert und in ein Plexiglasgitter eingespannt werden. Um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, wurde das fertige Sandwich mehrmals unter Druck mit einem Zentrifugenglas berollt. Daraufhin wurde das Eisfach des Transfertanks befüllt und das Sandwich so in dessen Halterungen eingesetzt, dass die Proteine in anodischer Richtung auf die Nitrocellulosemembran geblottet werden konnten. Daraufhin konnte schließlich der Proteintransfer durch anlegen einer Spannung von 80 V für 1 h gestartet werden. Die ausreichende Proteinübertragung auf die Membran wurde anschließend durch eine Coomassie-Färbung des Gels und durch die Erscheinung des Rainbow-Markers auf der Nitrocellulosemembran kontrolliert.

2.3.4.2. Detektion und immunologischer Nachweis

Für das nachfolgend beschriebene immunchemische Protokoll wurden folgender Puffer und Antikörper verwendet:

Tris-buffered saline-Tween (TBS-T):

Tris/HCl, pH 7,6; 20 mM

NaCl 137 mM

Tween-20 (0,1 %)

Erstantikörper:

Anti-GFAP, monoklonal, Quelle: Maus	(Sigma)
Verdünnung: 1:2000	
Anti-Hsp-27, polyklonal, Quelle: Kaninchen	(Upstate)
Verdünnung: 1:500	
Anti-Cholineacetyltransferase, polyklonal, Quelle: Ziege	(Chemicon)
Verdünnung: 1:200	
Anti Bcl-2, monoklonal, Quelle: Maus	(Sigma)
Verdünnung: 1:500	

Zweitantikörper:

Anti-Maus, peroxidasegekoppelt, Quelle: Ziege	(Dianova)
Verdünnung: 1:20000	
Anti-Kaninchen, peroxidasegekoppelt, Quelle: Ziege	(Dianova)
Verdünnung: 1:50000	
Anti-Ziege, peroxidasegekoppelt, Quelle: Esel	(Dianova)
Verdünnung: 1:50000	

Der immunologische Nachweis der entsprechenden Proteine wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Blocken unspezifischer Bindungen: Inkubation der Nitrocellulosemembran in einer Emulsion aus Magermilchpulver (5 %) in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur
2. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
3. Erstantikörper in TBS-T verdünnt: über Nacht bei 4 °C
4. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
5. Zweitantikörper in TBS-T verdünnt: 1 h bei Raumtemperatur
6. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
7. Nachweisreaktion: Die Detektion erfolgte nach dem „enhanced chemoluminescence-kit“ (ECL) der Firma Amersham:

Der Blot wurde in einer im Verhältnis 1:1 frisch angesetzten Lösung aus ECL 1- und ECL 2-Lösung für genau 1 min inkubiert, danach mit der Rückseite auf eine trockene Glasplatte gelegt und sofort mit Haushaltsfolie überzogen. Die Visualisierung der entsprechenden Banden erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms und dessen anschließende Entwicklung.

2.3.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE)

Die 2D-GE ist eine elektrophoretische Technik zur Separation komplexer Proteingemische, die aus zwei aufeinanderfolgenden Auftrennungsschritten besteht. Die erste Dimension ist eine isoelektrische Fokussierung (IEF), d.h. hier werden die zuvor solubilisierten Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülladung aufgetrennt. Bei diesem Prozeß wandert ein zwitterionisches Protein solange im elektrischen Feld, bis es den pH-Wert erreicht hat, bei dem seine Nettoladung Null ist, dem s.g. isoelektrischen Punkt (pI). Dieser hängt wesentlich vom Gehalt basischer und saurer Aminosäuren eines Proteins ab und kann bei ansonsten massengleichen Proteinen sehr unterschiedlich sein. In der zweiten Dimension werden die zuvor isoelektrisch fokussierten Proteine dann aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmasse aufgetrennt; es handelt sich hierbei also um das bereits beschriebene Prinzip der SDS-PAGE.

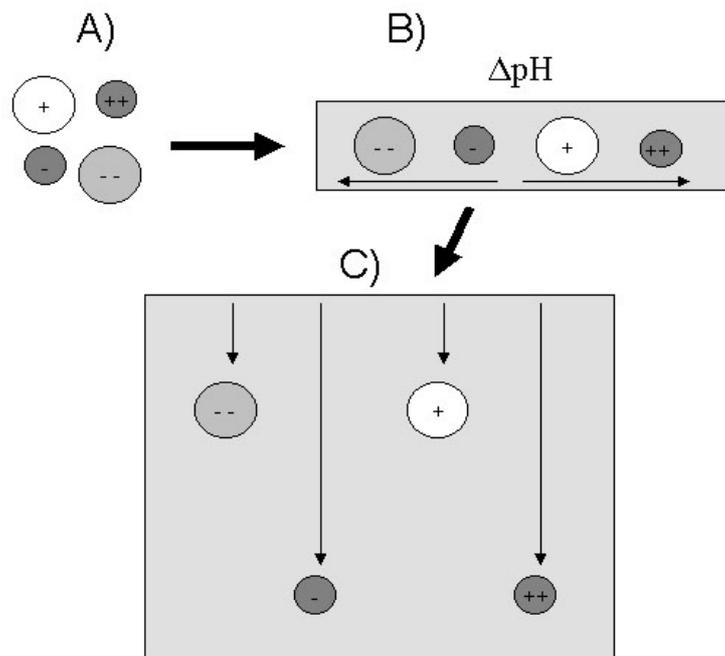


Abb. 7 Schema zur Verdeutlichung der 2D-Elektrophorese

Ein komplexes Gemisch gelöster Proteine unterschiedlicher Molekülladung und Masse (A) wird zunächst gemäß der isoelektrischen Punkte in einem pH-Gradienten (B) separiert. Der zweite Schritt ist eine herkömmliche Elektrophorese mit massenabhängiger Auftrennung der Proteine (C).

2.3.5.1. Probenaufarbeitung

Eingesetzte Lösungen zur Solubilisierung der retinalen Proteine:

<u>Lysepuffer:</u>	<u>Einzellösungen:</u>
Harnstoff 8M	SDS 10 %
CHAPS 4 %	PMSF 100mM
Pharmalyte 2 %	DDT 10%

Eine Retina wurde zunächst nach Zugabe von 10 μ l SDS-, 5 μ l PMSF- und 5 μ l DDT-Lösung für 5 min bei 95 °C erhitzt. Nachdem das so vorgelöste Gewebe mit 485 μ l Lysepuffer versetzt worden war, erfolgten mechanische Zerkleinerung und endgültige Solubilisierung durch Sonifizierung. Hierbei war eine Überhitzung der Probe auszuschließen, da sich der Solubilisierungsgrad der Proteine damit ändern konnte. Daraufhin wurden nicht gelöste Bestandteile abzentrifugiert, und die anschließende Proteinbestimmung verlief wie unter 2.3.2. beschrieben.

2.3.5.2. Probenauftrag und Rehydratation eines IPG-Strips

<u>Rehydratationslösung:</u>	<u>Einzellösungen:</u>
Harnstoff 8 M	Proteinlösung (x μ l, 300 μ g entsprechend)
CHAPS 2 %	DDT 10 % (10 μ l)
BPB 0,002 %	Pharmalyte (7 μ l)
Aqua dest.	
ad. 350 μ l (- x μ l)	

Das Volumen Proteinlösung, welches 300 μ g Protein entsprach, wurde bis auf das Gesamtvolumen von 350 μ l mit Rehydratationslösung und den übrigen Einzellösungen aufgefüllt und vermischt. Diese Auftragslösung wurde in je eine Rinne des Reswelling Trays überführt. Daraufhin wurde der IPG-Strips mit der Gelseite nach unten und definierter pH-Ausrichtung in die Lösung der jeweiligen Rinne gelegt. Eventuell entstandene Luftblasen unter dem Gel waren mit einer Pinzette zu entfernen. Zuletzt wurde jede Rinne des Trays zum Schutz vor Harnstoffkristallbildung mit Cover Fluid überschichtet. Die Quellung der IPG-Strips und somit die Aufnahme der Proteine erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.3.5.3. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Zunächst wurde die Multiphor-Apparatur für die Aufnahme der rehydratisierten IPG-Strips vorbereitet. Die Kühlung wurde auf 18 °C gestellt und die Kühlplatte mit etwas Wasser benetzt. Anschließend wurde das Dry Strip Tray unter Vermeidung größerer Luftblasenbildung auf der Kühlplatte fixiert und die Polung etabliert. Dann folgte die gleichmäßige Benetzung des Dry Strip Trays von innen mit Cover Fluid, um eine gleichmäßige Kühlung des Fokussierungsbereich zu gewährleisten. Nun konnte ebenfalls unter Vermeidung von Luftblasenbildung der Dry Strip Aligner auf das Cover Fluid gelegt werden. Die rehydratisierten IPG-Strips wurden kurz mit Aqua dest. gespült und dann mit der Gelseite nach oben und definierter pH-Ausrichtung in je eine Rinne des Aligners gelegt. Die zugeschnittenen und mit Aqua dest. getränkten Papierelektroden wurden auf das saure und basische Ende der nebeneinanderliegenden Gele gelegt und über Steckkontakte mit den Polen verbunden. Der Fokussierungsbereich wurde zum Schluß wieder mit Cover Fluid überschichtet.

Die isoelektrische Fokussierung wurde dann nach folgendem Protokoll durchlaufen:

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1. 150 V (1 h) | 6. 1800 V (15 min) |
| 2. 300 V (2 h) | 7. 2300 V (15 min) |
| 3. 600 V (1 h) | 8. 2800 V (15 min) |
| 4. 800 V (30 min) | 9. 3500 V (20 h) |
| 5. 1300 V (15 min) | |

Durch die baldige Migration von BPB zur Anode konnte ein Stromfluß sichergestellt werden, dieser Vorgang bedeutet aber noch keineswegs den Endpunkt der Fokussierung.

2.3.5.4. Gießen der Gele

Für die Proteinseparation in der 2. Dimension wurden 12,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Auf ein Sammelgel wurde hier verzichtet, da die fokussierten Proteine sich im IPG-Strip schon auf einer Linie befanden. Mit dem Gelgießstand konnten bis zu 6 Gele gleichzeitig gegossen werden und dazu wurden folgende Lösungsmengen eingesetzt:

- Acrylamid (187,5 ml)
- Trenngelpuffer (112,5 ml)
- Aqua dest. (ad 450 ml)

Nach Zugabe von 300 μ l TEMED und anschließend 750 μ l APS (20 %) wurde die Polymerisation initiiert. Die weitere Behandlung und Lagerung der Gele geschah wie unter 2.3.3.2. beschrieben.

2.3.5.5. Equilibrierung der fokussierten Proben

Equilibrierungslösung:

Tris-HCl, pH 8,8 (50mM)

Harnstoff 6 M

Glycerol 85 % (30 %)

SDS 2 %

BPB 0,002 %

Für den ersten Equilibrierungsschritt wurde obiger Lösung 40 μ l Mercaptoethanol, für den zweiten 100 mg Iodoacetamid (ad 4 ml/Strip) zugesetzt. Die fokussierten IPG-Strips wurden mit Aqua dest. gespült und für je 15 min bei Raumtemperatur equilibriert. Diese Schritte waren notwendig, um den Übergang der Proteine von der ersten zur zweiten Dimension zu erleichtern; aber auch um eine Artefaktbildung während der Elektrophorese zu verhindern, die durch Reoxidation von Thiolgruppen entstehen konnten.

2.3.5.6. Kontinuierliche Gelelektrophorese (2. Dimension)

Benötigte Lösungen:

Laufpuffer [wie unter 2.3.3. beschrieben]

heiße, wässrige Agaroselösung (0,5 %)

Die equilibrierten IPG-Strips wurden mit Aqua dest. abgespült und dann vorsichtig in definierter pH-Ausrichtung waagrecht auf die sich in der Glaskassette befindlichen Polyacrylamidgele gelegt. Zwischen IPG-Strip und Gel verblieben zunächst einige mm Abstand. Sodann wurden einige ml erhitzte Agaroselösung mit einer Pasteurpipette um die IPG-Strips herumgegossen, um zwischen ihnen und dem Gel eine elektrophoresetaugliche Verbindung herzustellen. Gleichzeitig wurden die IPG-Strips exakt waagrecht ausgerichtet und entstandene Luftblasen entfernt. Nachdem die Agarose sich verfestigt hatte und ein Teil des Laufpuffers in den unteren Teil der Elektrophoresezelle gegeben wurde, wurden die Gelkassetten in die dafür vorgesehenen Halterungen transferiert. Daraufhin wurde die Zelle im oberen Teil weiter mit Laufpuffer

befüllt. Wenn Dichtigkeit festgestellt wurde und die Kühlanlage auf 11 °C eingestellt war, konnte die Elektrophorese nach folgendem Protokoll gestartet werden:

300 V (30 min)

1200 V (4-5 h)

Kurz bevor die BPB-Front im Begriff war, aus dem Gel auszutreten, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele aus den Kassetten genommen. Die Gele wurden in Kunststoff-Trays überführt unter ständiger Agitation über Nacht fixiert.

2.3.5.7. Fixierung und Färbung der Gele

Die zweidimensional aufgetrennten Proteine wurden einer Färbung mit kolloidalem Coomassie nach Neuhoff (1988, modifiziert nach Doherty et al., 1998) unterzogen. Die normale Coomassie-Färbung wie unter 2.3.3.4. beschrieben konnte hier aufgrund der mangelnden Sensitivität nicht angewendet werden.

Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Fixierung:	Ethanol (50 %)	
	Phosphorsäure (2 %)	über Nacht
2. Waschen:	Aqua dest. (3 x 100 ml)	3 x 30 min
3. Inkubation:	Methanol (34 %)	
	Phosphorsäure (2 %)	
	Ammoniumsulfat (17 %)	1 h
4. Färbung:	Methanol (34 %)	
	Phosphorsäure (2 %)	
	Ammoniumsulfat (17 %)	
	Coomassie G 250 (0,066 %)	2-4 Tage

Zur Kontrolle nach der Coomassie-Färbung konnten die Gele auch einer Silberfärbung unterzogen werden, die nach dem Protokoll unter 2.3.3.4. durchgeführt wurde. Die weitere Lagerung der erfolgte für Coomassiegele in Inkubationslösung und für Silbergele in Ethanol 30 % bei 4 °C. Die gefärbten Gele wurden mit einem handelsüblichen

Büroscanner eingescannt und ohne spezielle Software ausgewertet. Die Expressionsänderung eines Proteins im Vergleich zu Kontrollgruppen wurde dann als relevant angesehen, wenn sie mindestens in 75 % der Fälle auftrat. Solche Proteinspots, vorzugsweise coomassiegefärbt, wurden aus dem Gel isoliert und einer MALDI-TOF-MS-Analyse zugeführt.

2.3.5.8. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Die MALDI-TOF-MS ist ein spektroskopisches Verfahren zur Identifizierung von Proteinen über die Bestimmung der Masse der daraus erzeugbaren Fragmente. Das Verfahren beinhaltet zunächst einen in-Gel-Verdau, die Überführung der Proteinfragmente in die Gasphase und deren Ionisierung. Die darauf folgende Detektion der Massen hat für ein bestimmtes Molekül Fingerprint-Charakter und kann unter Hinzuziehung eines Datenbankabgleiches zu dessen Identifizierung herangezogen werden.

Die in Rahmen der vorliegenden Arbeit vorliegenden MALDI-TOF-MS-Analysen wurden von der Abteilung „Integrierte funktionelle Genomik“ (IFG) der Universität Münster durchgeführt. Der genaue Verfahrensablauf soll daher nicht an dieser Stelle erwähnt werden.

2.4. Statistik

Bei als Stichproben aufzufassenden quantitativen Daten wurden grundsätzlich Mittelwerte, Standardabweichung und Varianzen berechnet. Zu solchen Daten gehörten im Rahmen dieser Arbeit die Zelldichten überlebender normaler und regenerierter RGZ sowie transzellulär gefärbter Mikrogliazellen. Diese Daten wurden zwecks Auswertung einem t -Test unterworfen, in dem zwei Mittelwerte m_1 und m_2 mit den Umfängen n_1 und n_2 verglichen wurden, die annähernd normalverteilt und deren Varianzen s_1^2 und s_2^2 zufällig sein mußten. Gemäß des t -Tests unterscheiden sich zwei Mittelwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α nur dann zufällig voneinander, wenn der für die Testgröße berechnete Wert t_0 kleiner ist als der Tafelwert t_T der *Student's t*-Verteilung (für α und die entsprechenden Freiheitsgrade). Vergleichene Werte unterscheiden sich dann signifikant, wenn $0,05 > \alpha > 0,01$; sehr signifikant wenn $0,01 > \alpha > 0,001$ und äußerst signifikant wenn $0,001 > \alpha$.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Ziel dieses Versuchsvorhabens war es, Proteine zu identifizieren, deren Expression sich in Retinae während der Regeneration von RGZ im Vergleich zu Kontrollgruppen ändert. Als Versuchsgruppen wurden hier *unbehandelte Retinae (Ko)*; *Retinae 2 Wochen nach Sehnervaxotomie (Ax)* sowie solche *2 Wochen nach Axotomie und gleichzeitiger Ischiasnervtransplantation (Ax+Tr)* verglichen. Da der einzige Unterschied zwischen Retinae der Gruppen (Ax) und (Ax+Tr) in der axonalen Regeneration von RGZ besteht, sollten eventuelle Expressionsunterschiede hier regenerationsspezifisch sein. Sinn der Einbeziehung der axotomierten Retinae war es, Proteine zu erkennen, deren Expression sich bereits durch die Axotomie ändert. Da regenerierte Retinae ebenfalls zunächst einer Axotomie unterzogen wurden, war deren alleiniger Vergleich mit unbehandelten (Ko) für regenerationsrelevante Aussagen nicht ausreichend.

Für die Untersuchungen wurden je 300 µg Protein aufgetragen und die Separation für jede Versuchsgruppe 4 mal durchgeführt. Die Gele wurden zunächst einer Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau unterzogen und in ca. 50 % der Fälle zur Kontrolle wieder entfärbt und mit Silber nachgefärbt. Es stellte sich heraus, dass der Bereich höherer Molekülmassen (ab ca. 35 kD) trotz strikter Vorgehensweise sehr schwierig reproduzierbar darzustellen war. Die Reproduzierbarkeit des Bereichs unterhalb 35 kD jedoch verlief gut und deshalb wurde nur diese Zone für den Proteinmustervergleich herangezogen (Vergl. Abb. 8-10). Damit standen aber immer noch relativ große Bereiche zur Auswertung zur Verfügung.

Unterschiede in den Proteinmustern der Abb. 8 – 10, die eventuell ausserhalb der markierten Zonen auffallen, waren nicht reproduzierbar und wurden somit zur Auswertung nicht herangezogen.

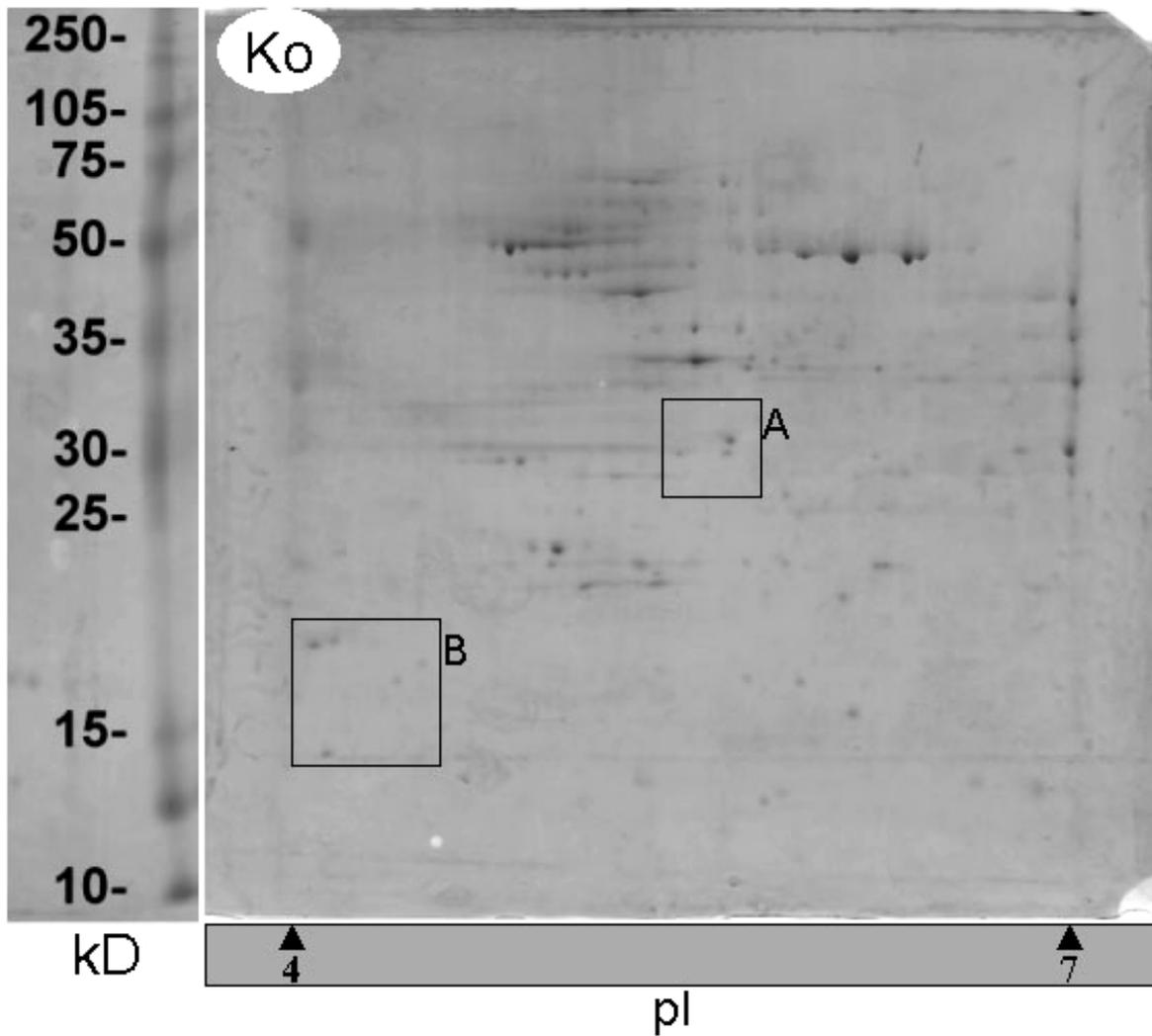


Abb. 8 Detailliertere Aufnahme eines 2D-Gels nach Coomassie-Färbung (Ko-Gruppe)

Dargestellt ist das Proteinmuster einer unbehandelten Retina. Die Proteinauftragsmenge betrug 300 μg . Zwei später zu analysierende relevante Zonen sind hervorgehoben; A bei Molmassen von ca. 30 kD und einem isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 5,5 sowie B bei ca. 18 kD und pI ca. 4,5.

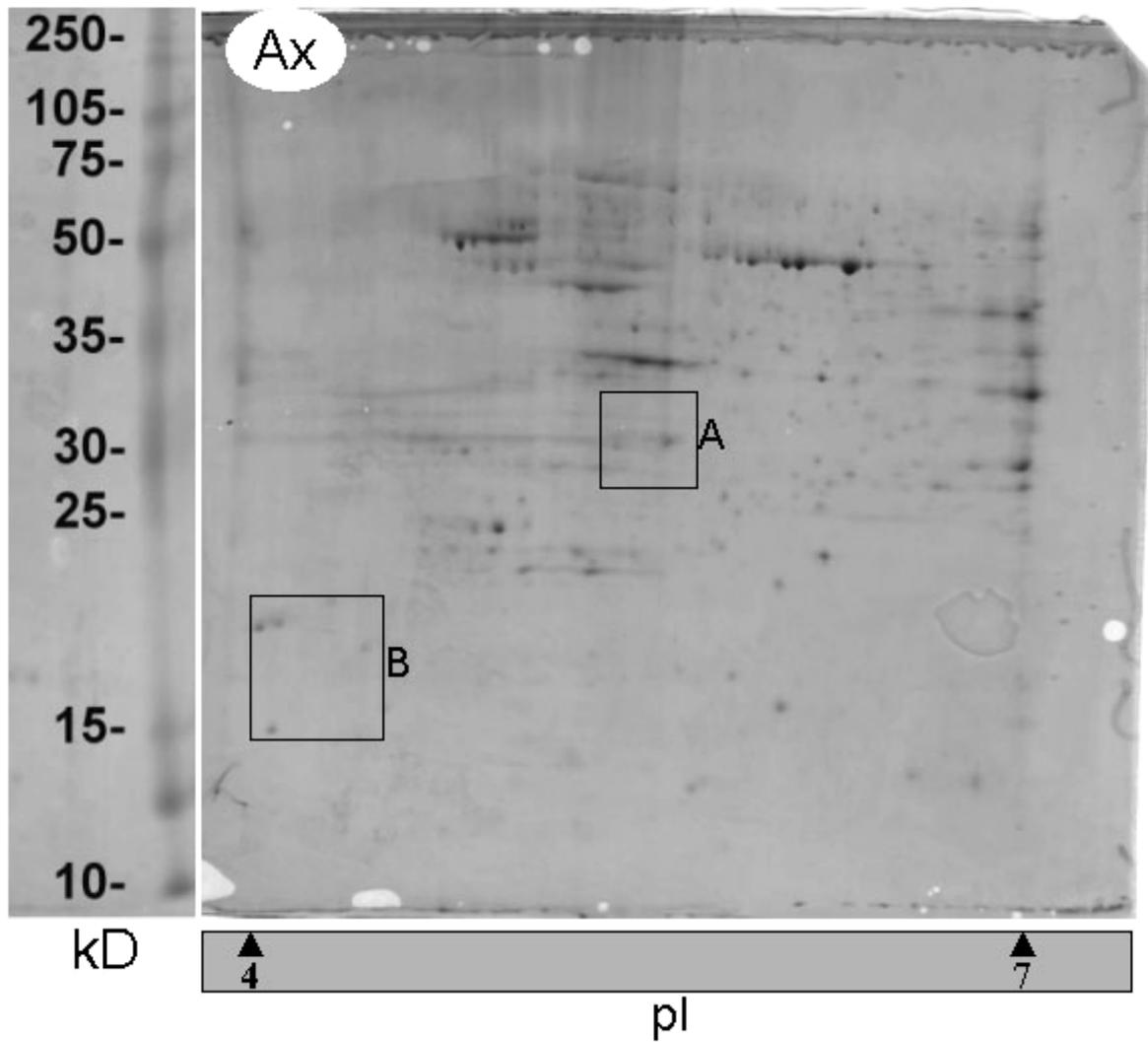


Abb. 9 Detailliertere Aufnahme eines 2D-Gels nach Coomassie-Färbung (Ax-Gruppe)

Hier ist das Proteinmuster einer Retina dargestellt, die 2 Wochen nach Sehnervaxotomie erhalten wurde. Die Proteinauftragsmenge betrug wiederum 300 μg . Die beiden relevanten Zonen A und B sind auch hier markiert worden.

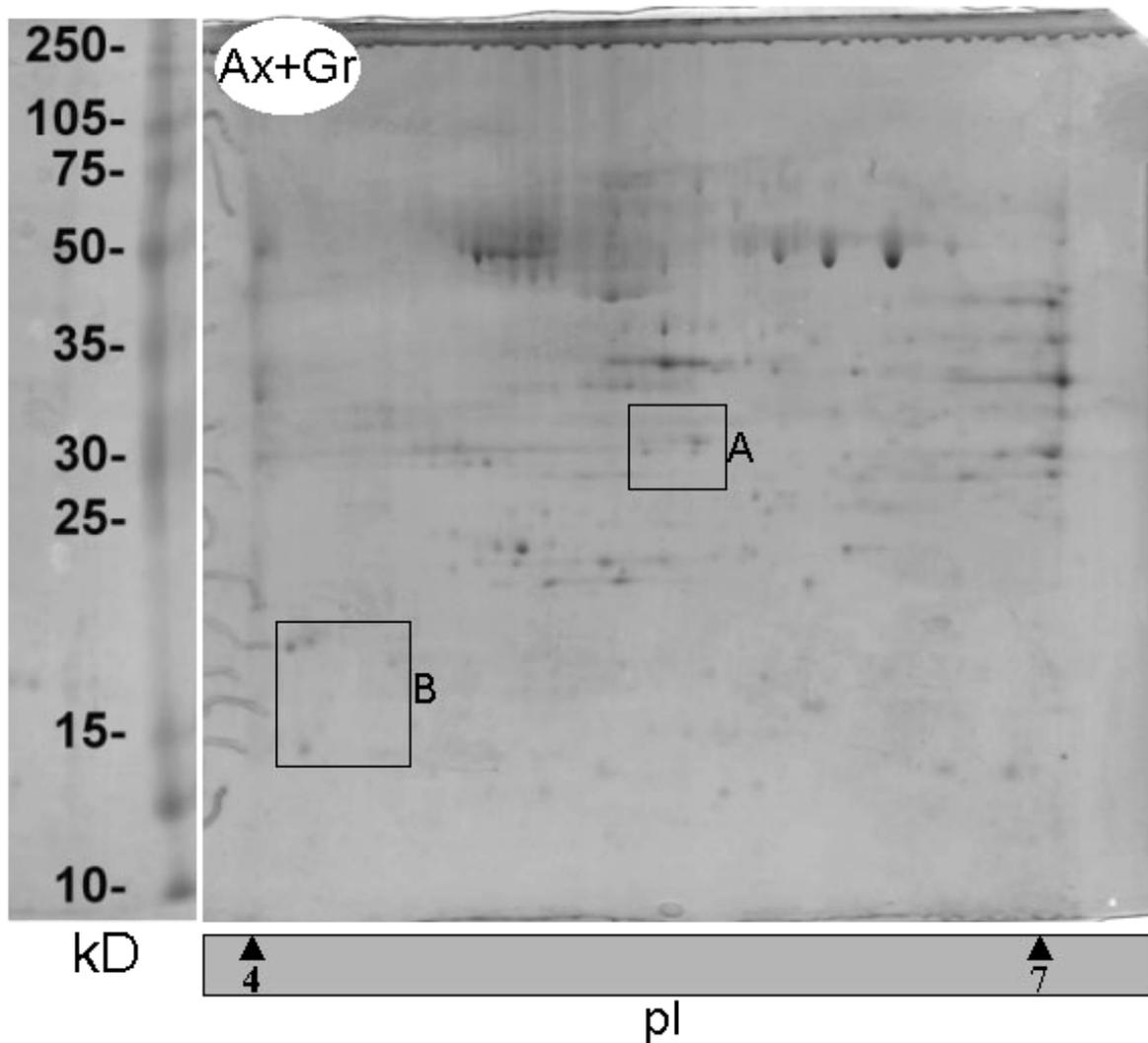


Abb. 10 Detailliertere Aufnahme eines 2D-Gels nach Coomassie-Färbung (Ax+Gr- Gruppe)

Dieses Gel zeigt das Muster von 300 µg aufgetrennten Proteins einer regenerierten Retina, also 2 Wochen nach Sehnervaxotomie und gleichzeitiger Ischiasnervtransplantation. Die beiden relevanten Zonen A und B sind hier abermals markiert worden.

3.1.1. Auswertung von Zone A (ca. 30 kD/pI 5,5)

Hier wurde ein Spot auffällig, der in allen (4 von 4) unbehandelten Retinae exprimiert wurde und bei einer kolloidalen Coomassiefärbung gut sichtbar war. Dieser Spot wurde in 3 von 4 axotomierten Retinae teilweise bis zur Detektionsgrenze herunterreguliert und war in Retinae nach Ganglienzellregeneration in 3 von 4 Fällen wieder wesentlich deutlicher zu sehen.

Dieser in regenerierten Retinae wieder hochregulierte Spot wurde mittels MALDI-TOF-MS als β (B2)-Kristallin identifiziert. Die reale Molmasse von β (B2)-Kristallin von 24 kD stimmt hierbei mit dem geschätzten Wert vom 2D-Gel (ca. 30 kD) noch relativ gut überein (leichte Unstimmigkeiten mit dem Marker sind möglich, da die 30 kD-Bande *per se* schon weit auseinandergezogen ist). Eine solche differentielle Expression konnte auch durch eine Silber-Kontrollfärbung bestätigt werden. Hier zeigt sich bereits, dass die beschriebene proteinchemisch meßbare Veränderung ohne Einbeziehung von axotomierten Retinae wohl unmöglich gewesen wäre (Vergl. Abb. 11).

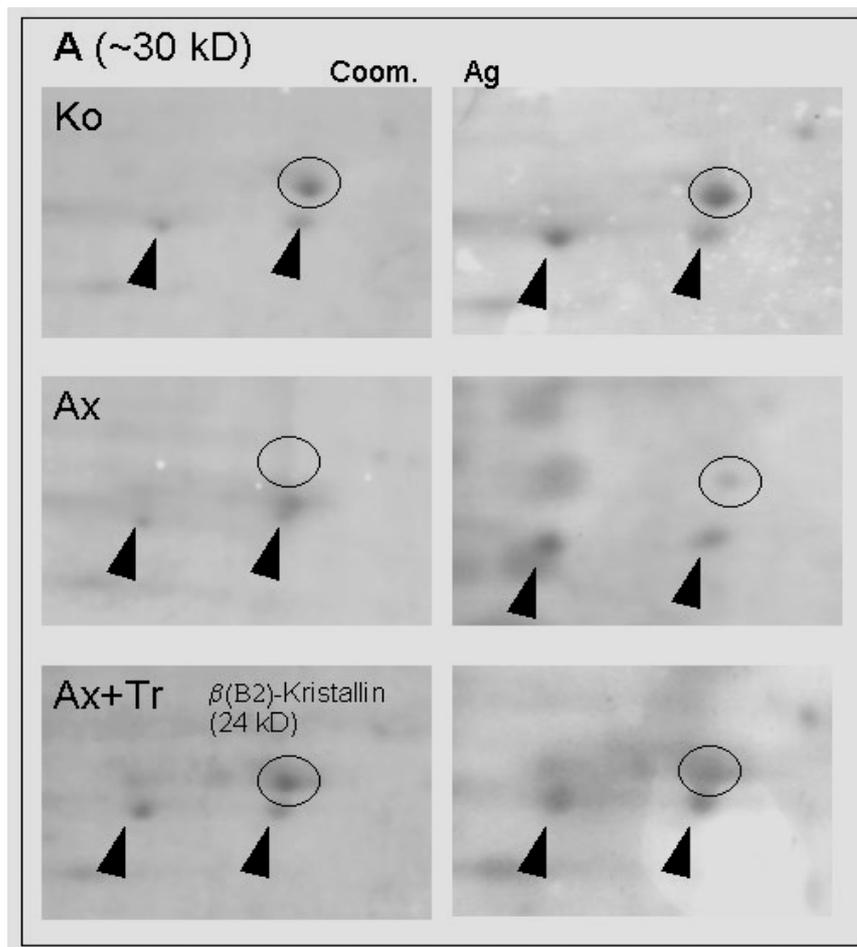


Abb. 11 Vergrößerte Darstellung von Zone A - Vergleich der Proteinmuster der jeweiligen Versuchsgruppen

In der linken Bildfolge ist Zone A nach Coomassie-, in der rechten nach Silber-Kontrollfärbung dargestellt. Der differentiel exprimierte Spot ist jeweils durch einen Kreis markiert und konnte durch MALDI-Analyse als β -Kristallin (24 kD) identifiziert werden. Pfeilspitzen markieren jeweils Spots, die sich zwischen den Versuchsgruppen nicht wesentlich unterscheiden (Fixpunkte). Abkürzungen: Ko = unbehandelte Retina, Ax = 2 Wochen nach Sehnervaxotomie, Ax+Tr = 2 Wochen nach Axotomie und Ischiasnervtransplantation für axonale Regeneration

3.1.2. Auswertung von Zone B (ca. 18 kD/pl 4,5)

In dieser Zone wurde ein Spot gefunden, der in unbehandelten Retinae nach Coomassiefärbung zwar relativ schwach, aber sehr reproduzierbar in allen Fällen sichtbar war. Dieser Spot konnte sowohl in allen axotomierten als auch in allen regenerierten Retinae ungeachtet der Färbemethode nicht mehr detektiert werden. Es scheint, als ob das Vorliegen dieses Proteins unter den gegebenen Bedingungen mit der Intaktheit der Retina korreliert (Vergl. Abb. 12). Allerdings ist in diesem Fall die Identifizierung trotz mehrmaliger Versuche nicht eindeutig gelungen. Aufgrund dieser Unsicherheit soll eine kurze Erläuterung der Funktion dieses Proteins nur hier und nicht in der Diskussion gegeben werden. Es handelt sich hierbei möglicherweise um ein nukleäres Histonprotein. H1 Histone spielen eine Rolle bei der Chromatinkondensation und werden vor allem in Zellen im terminalen Differenzierungsstadium oder mit geringer Mitoserate gefunden (<http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P43278>). Möglicherweise enthalten RGZ größere Mengen dieses Histons, und durch den Zellverlust in axotomierten und auch regenerierten Retinae könnte es deshalb nicht mehr nachweisbar sein.

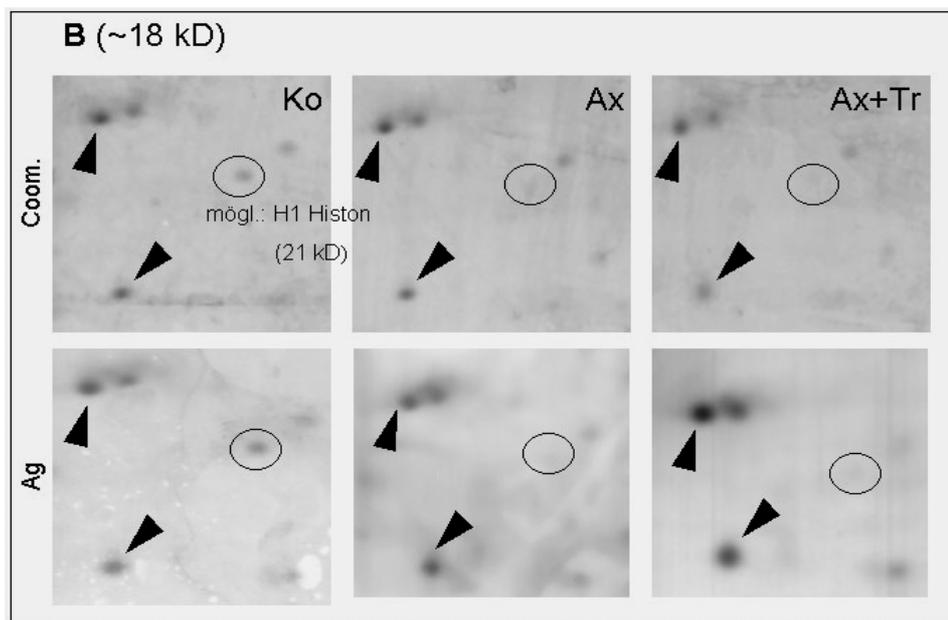


Abb. 12 Vergrößerte Darstellung von Zone B - Vergleich der Proteinmuster der jeweiligen Versuchsgruppen

Die betreffende Zone ist wiederum in der oberen Bildfolge mit Coomassie und in der unteren mit Silber angefärbt worden. Es ist deutlich erkennbar, dass der mit einem Kreis markierte relevante Spot nur in unbehandelten (Ko-) Retinae exprimiert wird und weder nach Axotomie (Ax) noch nach axonaler Regeneration der Ganglienzellen (Ax+Tr) nachgebildet wird. Es handelt sich möglicherweise um Histon-Protein Die Pfeilspitzen zeigen abermals orientierende Fixpunkte an.

3.1.3. Verifizierung von MALDI-Ergebnissen

Mit dem in der 2D-Gel-Analyse differentiell exprimierten und spektroskopisch als β (B2)-Kristallin identifizierten Proteinspot handelt es sich um einen bekannten Proteintyp, gegen den bereits Antikörper entwickelt wurden. Es bot sich somit an, das vorgefundene Expressionsmuster im Rahmen einer Immunhistochemie innerhalb der beteiligten Versuchsgruppen nachzuvollziehen. Dazu wurden von den Augen der unterschiedlichen Gruppen (3 je Gruppe) Kryostatquerschnitte angefertigt, bei denen die charakteristische laminare Struktur der Retinae sichtbar wurden. Aufgrund der Verfügbarkeit wurde das retinale Expressionsmuster von β (B2)-Kristallin mit einem Antikörper gegen β_H -Kristallin (H = heavy chain) überprüft.

Es stellte sich heraus, dass β_H -Kristallin im Normalzustand in allen nukleären Schichten der *neuralen* Retina exprimiert wird. Das bedeutet in der Ganglienzellschicht, in der vorwiegend aus Bipolarneuronen bestehenden inneren nukleären Schicht als auch in der äußeren nukleären Schicht, die sich aus den Kernen der Photorezeptoren zusammensetzt (Vergl. Abb. 2 u.13). In Retinae, die 2 Wochen nach Sehnervaxotomie erhalten wurden, war auffällig, dass die β -Kristallinexpression in der Ganglienzellschicht drastisch zurückgegangen ist. Ein etwas schwächerer Rückgang der Immunreaktivität zeigte sich hier auch in der äußeren nukleären Schicht. In Retinae nach Axotomie und Ganglienzellregeneration war die Immunreaktivität zumindest in der Ganglienzellschicht wieder erhöht (Vergl. Abb. 13). Insofern konnte das anhand der 2D-Gelanalyse gewonnene Expressionsmuster von β -Kristallin in unbehandelten, axotomierten und regenerierten Retinae prinzipiell bestätigt werden.

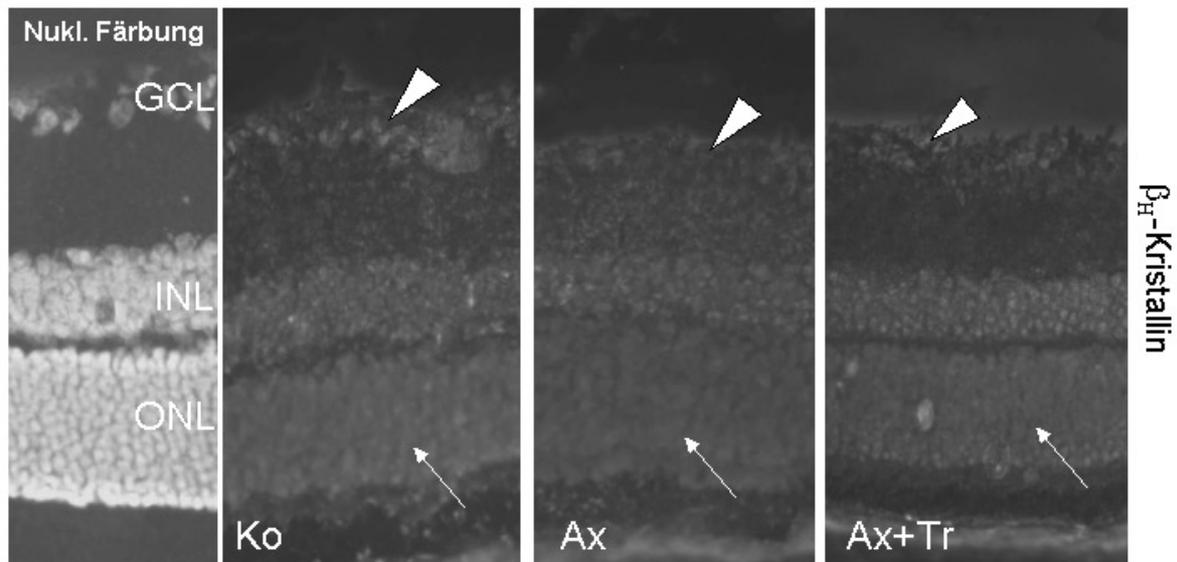


Abb. 13 Immunhistochemie gegen β_H -Kristallin

Gezeigt sind retinale Querschnitte der beteiligten Versuchsgruppen. Zur vergleichenden Darstellung der retinalen Schichtung wurde eine Zellkernfärbung mit dem nukleinsäureaffinen Farbstoff DAPI durchgeführt. In der unbehandelten Retina erkennt man deutlich die β -Kristallinexpression in der Ganglienzellschicht (GCL), der inneren nukleären (INL) und äußeren nukleären Schicht (ONL). In axotomierten Retinae geht die Immunoreaktivität in der Ganglienzellschicht drastisch (Pfeilspitze), in der äußeren nukleären Schicht etwas zurück (Pfeil). Nach axonaler Regeneration von verletzten Ganglienzellaxonen ist die β -Kristallinexpression zumindest in der Ganglienzellschicht wieder erhöht (Pfeilspitze).

3.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels eindimensionaler Gelelektrophorese

Beim Vergleich der jeweiligen Proteinmuster in 1D-Gelen ist die Auftrennung längst nicht so effizient wie in 2D-Gelen. Dafür kann man davon ausgehen, dass bei der Isolierung einer differentiell exprimierten Bande nach Coomassiefärbung größere Proteinmengen erhalten werden. Zudem sollte durch 1D-Gele sichergestellt werden, dass eventuelle Expressionsunterschiede, durch die IEF horizontal auf mehrere Spots verteilt und damit möglicherweise verwischt wurden, nicht übersehen werden.

Hierfür wurden 50 µg Protein aus jeder Versuchsgruppe (n = 2) aufgetragen und das Gel am Ende mit Coomassie-Blau nach konventioneller Methodik gefärbt. Bei der Auswertung fiel zunächst eine Bande bei ca. 35 kD auf, die sowohl in axotomierten Retinae als auch in solchen nach Ganglienzellregeneration stärker exprimiert wurde als in unbehandelten Kontrollen. Diese Veränderung war insofern auffällig, als dass die unmittelbar darüber liegende Bande in allen sechs Spuren unverändert zu bleiben schien. Im übrigen erschienen auch die restlichen Banden in allen Spuren gleichmäßig intensiv, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass gleich große Proteinmengen aufgetragen wurden. Desweiteren fiel eine Bande bei ca. 55 kD auf, die das gleiche Expressionsmuster wie die 35 kD-Bande zeigte. Da diese jedoch in zu starker Nachbarschaft mit anderen Banden stand, wurde sie nicht ausgeschnitten, da ihre alleinige Isolation unwahrscheinlich erschien (Vergl. Abb. 14).

Eine genaue Identifizierung des 35 kD-Proteins durch MALDI-Analyse war nicht möglich, es konnte aber ein möglicher Teffer für Syntaxin 1A ermittelt werden. Dafür würde das aus dem Gel geschätzte Molekulargewicht von ca. 35 kD mit der realen Masse von 35 kD gut übereinstimmen. Da aber keine Möglichkeit bestand, die Expression dieses Proteins durch eine unabhängige Methode zu bestätigen, soll dieses Ergebnis ebenso unter Vorbehalt bleiben und nicht im Diskussionsteil bewertet werden. Es soll hier lediglich erwähnt werden, dass die Expression von Syntaxin 1A vornehmlich im ZNS, z.B. Cortex und Retina, beschrieben worden ist. Man geht davon aus, dass diesem Protein eine Funktion beim Andocken von synaptischen Vesikeln in präsynaptischen aktiven Zonen zukommt (<http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P32851>). Von daher geht man davon aus, dass Syntaxin 1A eine Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung hat (Mishima et al., 2002).

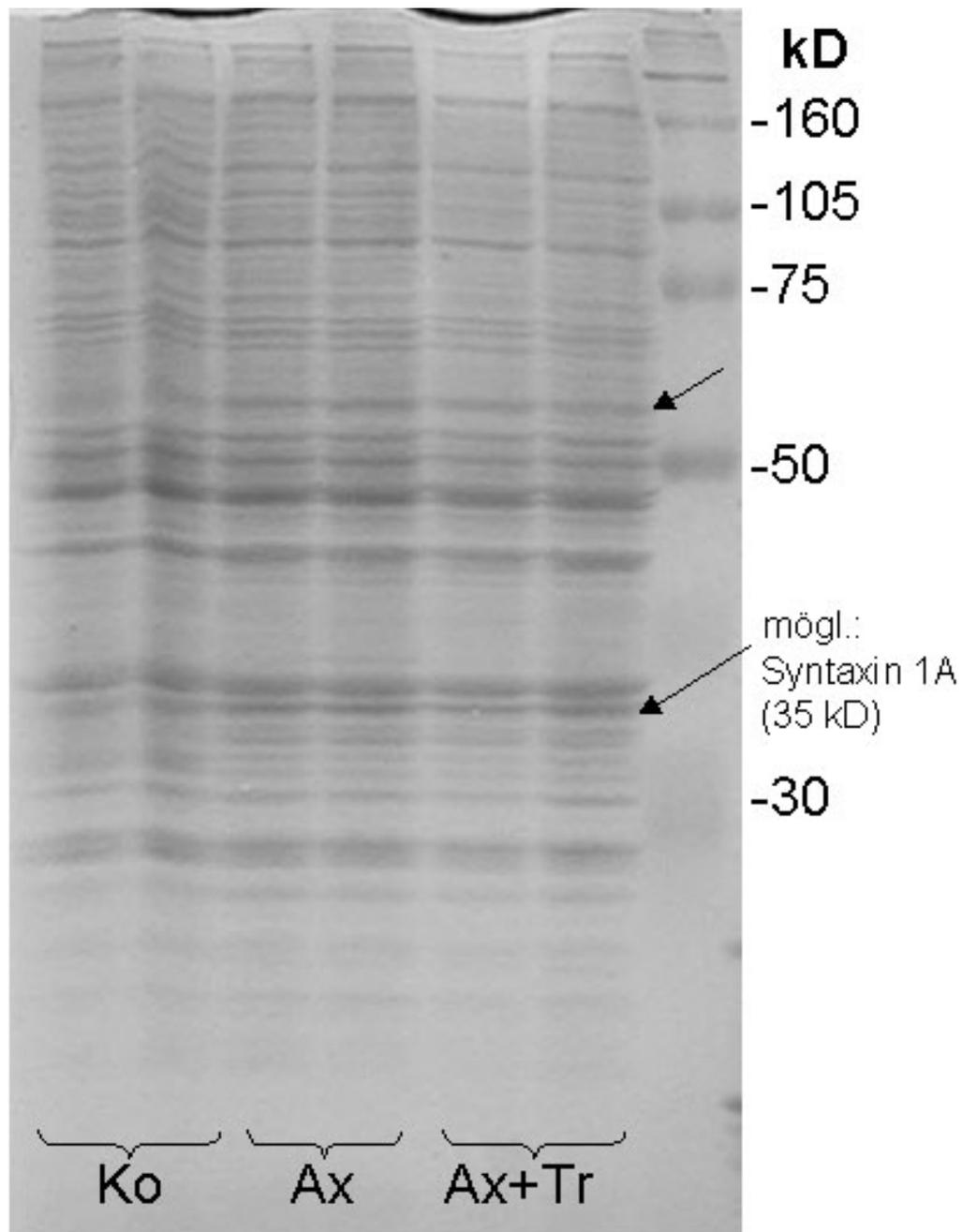


Abb. 14 Proteinmustervergleich durch 1D-Elektrophorese

Die Auftragsmenge betrug 50 μg retinales Protein pro Spur, aus jeder Gruppe wurden zwei verschiedene Retinae aufgetragen. Obwohl die Separationskapazität derjenigen der 2D-Elektrophorese weit unterlegen ist, sind auch hier differentiell exprimierte Proteinbanden erkennbar (ca. 55 kD, oberer Pfeil; ca. 35 kD, unterer Pfeil). Beiden Proteinen ist gemeinsam, dass sie bereits durch die Sehnervaxotomie hochreguliert werden und die Spiegel nach Regeneration relativ unverändert bleiben. Für die 35 kD-Bande konnte durch MALDI ein vorläufiger Treffer für Syntaxin 1A ermittelt werden. Für dieses Protein werden regulierende Funktionen in der synaptischen vesikulären Neurotransmitterfreisetzung diskutiert.

3.3. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels spezifischer Antikörper

3.3.1. Expressionsanalyse glialer Proteine

Wie eingangs erwähnt, interferiert Neuroglia sehr stark mit neuronaler Degeneration im ZNS. In der vorliegenden Arbeit sollten gliale Reaktionen aufgezeigt werden, die sich nach der Transplantation des Ischiasnervsegmentes in der Retina ereignen und mit der Regeneration von RGZ einhergehen. Die Untersuchungen wurden sowohl immunhistochemisch als durch *Western blot* vorgenommen. Als astroglialer Marker schien *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) angemessen. Dieses Protein wurde bereits in früheren Studien zur Detektion astroglialer Reaktionen nach Verletzungen verwendet (Bignami und Dahl, 1979). Als weiterer glialer Marker wurde *Bcl-2* hinzugezogen, da die Expression dieses Protoonkogens ebenfalls schon in Müllerglia der Retina beschrieben wurde (Chen et al., 1994). Als immunhistochemisch detektierbares Antigen für Mikrogliazellen bot sich *Complement-3 Rezeptor (Ox-42)* an. Dieser Marker wurde bereits bei der Degeneration von RGZ in der Kaninchenretina eingesetzt (Schnitzer und Scherer, 1994).

3.3.1.1. Immunhistochemie

GFAP war in den Retinae aller Versuchsgruppen detektierbar (n = 3). In unbehandelten Retinae war die Expression auf Astrocyten beschränkt, die sich an der vitreo-retinalen Übergangszone befinden (Abb. 15B, Pfeil). In Retinae, die 2 Wochen nach Sehnervaxotomie erhalten wurden, wurde eine Expressionssteigerung in den Astrocyten (Abb. 15C, Pfeil), aber auch ein leichter Anstieg in Müllerzellfortsätzen (Abb. 15C, Pfeilspitze) festgestellt. In regenerierten Retinae blieb die Expressionssteigerung in Astrocyten erhalten (Abb. 15D, Pfeil). Es zeigte sich hier jedoch eine weitere, selektive Hochregulation von GFAP in den Müllerzellen, deren Fortsätze deutlich sichtbar nahezu die gesamte retinale Tiefe durchspannen (Abb. 15D, Pfeilspitze).

Das Expressionsmuster von *Bcl-2* war innerhalb der Versuchsgruppen dem von GFAP ähnlich, jedoch auf Müllerzellfortsätze beschränkt (Abb. 15F-H, Pfeilspitze in H).

Ox-42-positive Zellen waren in unbehandelten Retinae nicht detektierbar (Abb. 15J). Sie wurden aber gleichermaßen in axotomierten Retinae und solchen nach RGZ-Regeneration immunoreaktiv (Abb. 15K, L; Pfeilspitzen). Während astrogliale Reaktionen besonders während der RGZ-Regeneration sichtbar wurden, schienen mikrogliale Reaktionen eher durch die Axotomie selbst induziert.

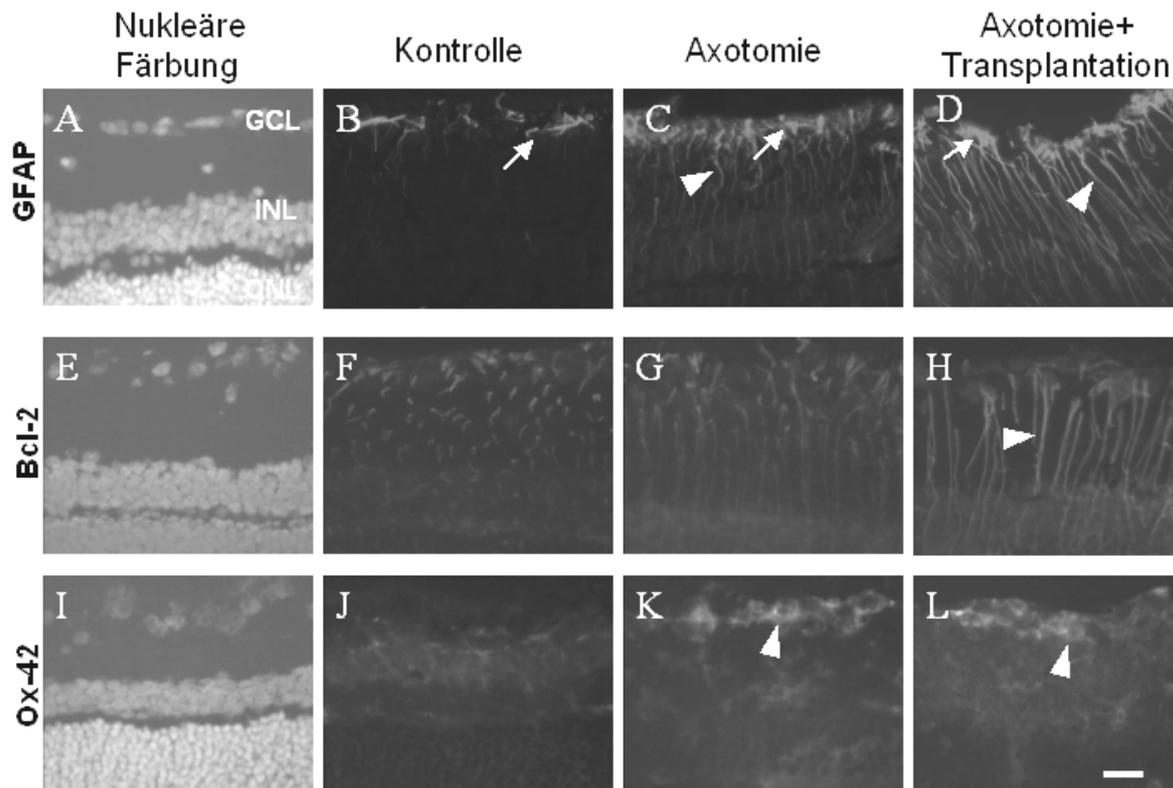


Abb. 15 Immunhistochemische Analyse glialer Reaktionen

Dargestellt sind retinale Querschnitte der beteiligten Versuchsgruppen, die gegen die glialen Proteine **GFAP** (B - D), **Bcl-2** (F - H) und **Ox-42** (J - L) angefärbt worden sind. Zur besseren Orientierung wurde eine nukleäre Färbung mit DAPI durchgeführt. Man beachte die strukturellen Veränderungen von GFAP- und Bcl-2- positiven Müllerzellen, die besonders nach Sehnerversatz durch ein Ischiassegment auftreten (D, H; Pfeilspitzen). Ein Anstieg der GFAP-Immunoreaktivität wird auch in Astrocyten an der vitreo-retinalen Grenze deutlich (C, D; Pfeile). Während Müllerzellen besonders während der RGZ-Regeneration aktiviert werden, geschieht dies bei Ox-42-positiven Zellen, wahrscheinlich Mikroglia, bereits durch die Axotomie (K, L; Pfeilspitzen). Maßstab = 20 μ M. Abkürzungen: GCL = Ganglienzellschicht; INL = Innere nukleäre Schicht; ONL = Äußere nukleäre Schicht.

3.3.1.2. *Western blot*

Die *Western blot*-Analyse zur Kontrolle der histochemisch erhaltenen Ergebnisse wurde mit denselben Antikörpern wie bei der Immunhistochemie durchgeführt. Hierzu wurden je 50 µg retinaler Proteine zunächst elektrophoretisch separiert und dann immunchemisch nachgewiesen (n = 3). Dies führte beim Ox-42-Antikörper aufgrund zu vieler unspezifischer Banden jedoch nicht zu auswertbaren Befunden.

Das GFAP-spezifische Signal bei ca. 50 kD war in allen Gruppen klar detektierbar. In axotomierten Retinae ließ sich im Vergleich zu unbehandelten eine leichte Expressionssteigerung feststellen. Retinae, die nach Regeneration erhalten wurden zeigten eine wesentlich höhere Gesamtexpression von GFAP im Vergleich zu axotomierten und unbehandelten Retinae. Somit stimmt das hier vorgefundene GFAP-Expressionsmuster tendentiell gut mit den immunhistochemischen Ergebnissen überein (Vergl. Abb. 16, oberer Teil).

Etwas problematischer verlief die *Western blot*-Detektion von Bcl-2. Hier zeigte sich eine unspezifische Bande die bei ca. 30 kD in allen Versuchsgruppen ungefähr gleich stark auftrat. Sie lässt aber auch den Rückschluss zu, dass jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die Bcl-2-spezifische Bande bei ca. 26 kD war in unbehandelten Retinae nicht detektierbar, trat aber in regenerierten Retinae wieder stärker auf als in denen nach Axotomie alleine. Tendentiell gesehen würde damit auch dieser Blot (trotz der gleichbleibenden unspezifischen Bande) mit der immunhistochemisch gesehenen Bcl-2-Expression übereinstimmen (Vergl. Abb. 16, unterer Teil).

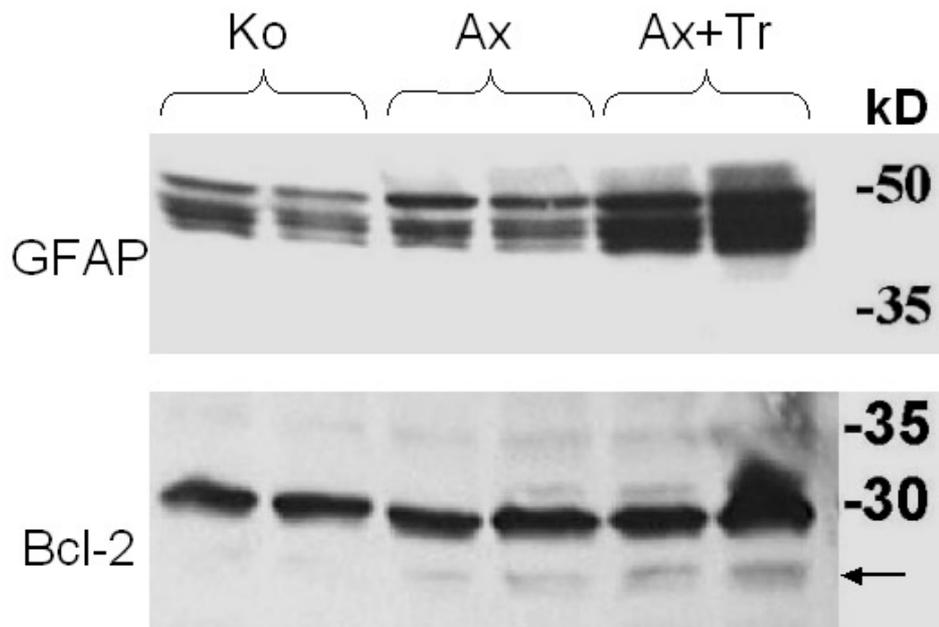


Abb. 16 Western-blot-Analyse glialer Proteine

Im oberen Abschnitt wird die retinale Gesamtexpression von GFAP, im unteren die von Bcl-2 innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen gezeigt.

Das **GFAP**-spezifische Signal bei ca. 50 kD wird in axotomierten Retinae (Ax) etwas stärker detektiert als in unbehandelten (Ko). Eine noch deutlichere Steigerung zeigt sich in der regenerierten Gruppe (Ax+Tr).

Das **Bcl-2**-spezifische Signal bei ca. 26 kD (Pfeil) wird in unbehandelten Retinae zwar nicht exprimiert, ist aber wie GFAP in regenerierten Retinae stärker als in axotomierten nachzuweisen. Somit zeigt sich in beiden Fällen eine tendentielle Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Befunden. Die unspezifische Bande im Bcl-2-Blot bei 30 kD zeigt die gleiche Proteinauftragsmenge an.

3.3.2. Expressionsanalyse von Hsp27

Heat-shock-Proteine sind eine evolutiv konservierte Proteinfamilie, deren Expression bei verschiedensten Stresseinwirkungen induziert werden kann (Morimoto et al., 1992). Insbesondere für Hsp27 liegt eine Funktion in Zellschutz- oder Reparatur nahe, da dessen Überexpression in Wurzelganglionneuronen mit dem Schutz vor Apoptose durch Neurotrophinentzug verbunden ist (Wagstaff et al., 1999). Insofern bestand auch im Rahmen dieser Arbeit Interesse, die Expression von Hsp27 während der De- und Regeneration von RGZ zu untersuchen und so eine mögliche Beteiligung nachzuweisen. Die Expression von Hsp27 wurde wieder sowohl durch Immunhistochemie an retinalen Querschnitten als auch durch *Western blot* untersucht.

Im *Western blot* (n = 3) war das Signal bei ca. 27 kD in unbehandelten Retinae nicht nachweisbar. Axotomie des Sehnerven führte (nach Kenntnis des induzierbaren Charakters) fast erwartungsgemäß zu einer Induktion und somit Nachweisbarkeit der Hsp27- Bande. In regenerierten Retinae war die Expression der Hsp27- Bande wieder auf deutlich niedrigere Niveaus herabgesetzt (Vergl. Abb. 17).

Das im *Western blot* vorgefundene Expressionsmuster von Hsp27 konnte prinzipiell auch wieder in der immunhistochemischen Analyse nachvollzogen werden (n = 3). In unbehandelten Retinae war das Protein nur als unspezifische Hintergrundfärbung nachzuweisen. Eine echte Expression konnte dann in axotomierten Retinae in Zellen der Ganglienzellschicht festgestellt werden. Eine Doppelfärbung mit Neurofilament ergab eine Kollokalisierung, so dass die Expression von Hsp27 mit hoher Wahrscheinlichkeit in noch lebenden Ganglienzellen stattfindet. In regenerierten Retinae war das Protein in der Ganglienzellschicht wieder herunterreguliert, obwohl die Neurofilamentfärbung die gleichzeitige Anwesenheit von Ganglienzellen zeigte sollte (Vergl. Abb. 17).

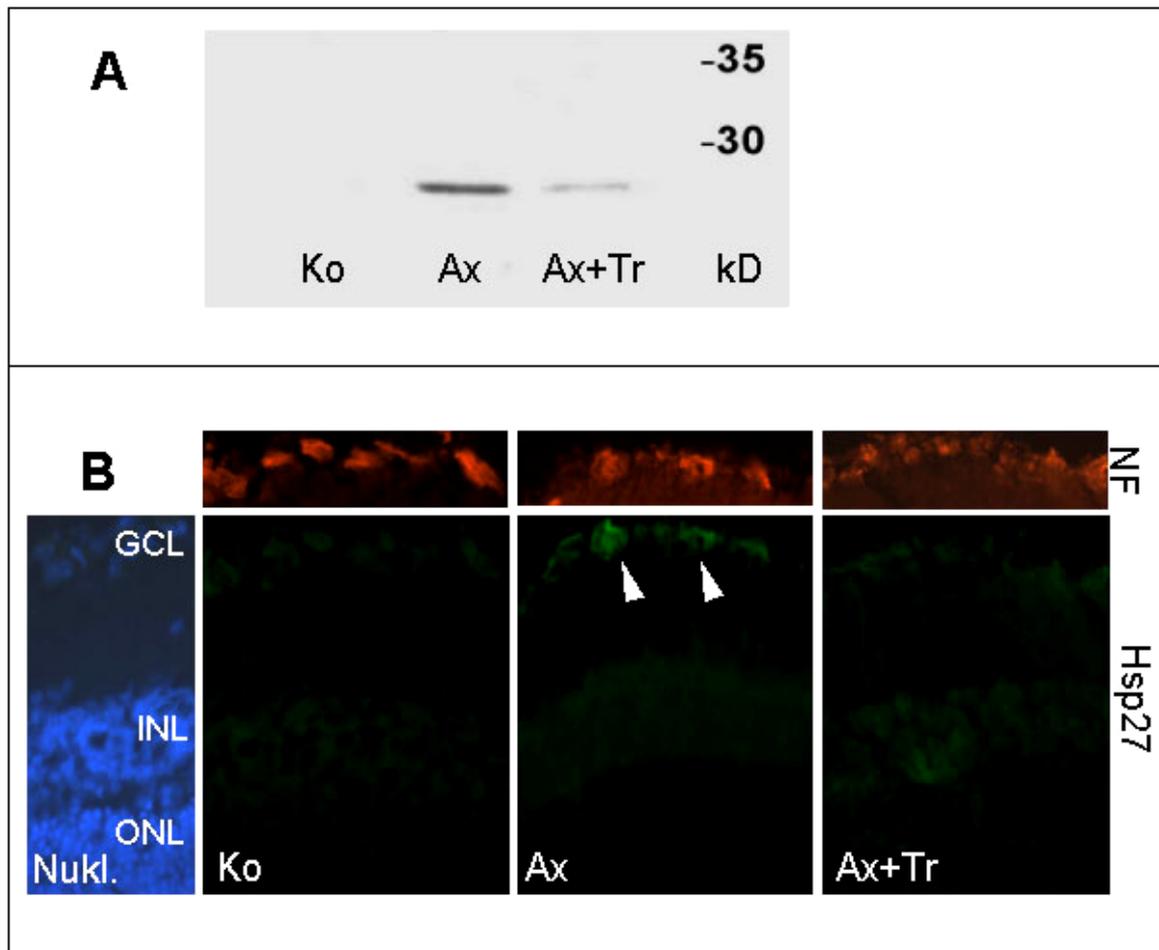
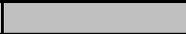
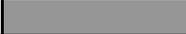
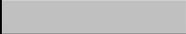
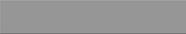
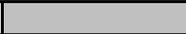


Abb. 17 *Western blot* und immunhistochemische Analyse von Hsp27

A. Hsp27 ist in unbehandelten Retinae nicht detektierbar (Ko), die Induktion erfolgt aber durch die Axotomie (Ax). Gleichzeitige Transplantation eines peripheren Nervensegmentes an den durchtrennten Sehnerven reguliert die Expression von Hsp27 wieder herunter (Ax+Tr).

B. Die Hsp27/Neurofilament (NF)-Doppelfärbung zeigt, dass die nach der Axotomie Hsp27-positiven Zellen in der Ganglienzellschicht sitzen und es sich bei diesen wahrscheinlich um überlebende Ganglienzellen handelt. In regenerierten Retinae ist die Expression in diesen Zellen wieder zurückgegangen (Ax+Tr).

Protein	retinales Expressionsmuster			Lokalisierung
	unbehandelt	axotomiert	regeneriert	
GFAP				Astroglia
Bcl-2				Astroglia
Ox-42				Mikroglia
Hsp27				Neurale Retina
β _H -Kristallin				Neurale Retina
H1 Histon *				?
Syntaxin 1A *				?

	keine detektable Expression
	schwach
	mittel
	stark

Tabelle 1 Tabellarische Zusammenstellung untersuchter Proteine

Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen dem jeweiligen untersuchten Protein und dem dazugehörigen Expressionsmuster in der Retina nach unterschiedlicher Behandlung. Regenerationsspezifische Expressionsänderungen zeigen nur GFAP, Bcl-2, Hsp27 und β _H-Kristallin. H1 Histon und Syntaxin 1A stehen unter Vorbehalt, da diese durch MALDI nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Sie standen aber in der Liste möglicher Treffer mit an der Spitze und paßten auch vom Molekulargewicht gut zu den aus den Gelen geschätzten Werten (s. Anhang).

3.4. Untersuchung funktioneller regenerationsspezifischer Veränderungen in RGZ durch neuroanatomische und immunchemische Techniken

Unter 1.2.2. wurde beschrieben, dass bei der axonalen Regeneration von RGZ in periphere Nervensegmente eine Myelinisierung der Axone durch Schwann'sche Zellen stattfindet. Diese Remyelinisierung ist mit dem generellen Myelinisierungsmuster des peripheren Nervensystems identisch (Watanabe et al., 1994). Die nachwachsenden Axone der zentralen Neurone werden also von Schwann'schen Zellen als periphere Axone erkannt. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass regenerierende RGZ möglicherweise Eigenschaften von peripheren Neuronen wie z.B. Motoneuronen, erlangen.

3.4.1. Untersuchung der Vulnerabilität regenerierter RGZ nach Re-Axotomie

3.4.1.1. Re-Axotomie im Transplantat

Zu peripher-neuronalen Eigenschaften gehört beispielsweise, dass nach Axotomie der retrograde Zelltod normalerweise ausbleibt und keine Phagozytose durch benachbarte Zellen erfolgt (Kreutzberg, 1982, für Übersicht). Deswegen sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Vulnerabilität regenerierter RGZ nach weiterer axonaler Verletzungen gegenüber normalen RGZ verändert ist. Dazu wurden axotomierte RGZ, deren Axone in ausreichender Länge in das Ischiassegment eingewachsen waren, einer Re-Axotomie und retrograder Färbung vom Transplantat aus unterzogen. Das neuronale Überleben und die Phagozytose durch Mikroglia wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen bestimmt und mit dem von normalen RGZ nach Sehnervaxotomie und retrograder Markierung verglichen.

Die Re-Axotomie wurde ca. 3 mm hinter der Opticus-Ischias-Verbindung durchgeführt, da eine distale Axotomie *per se* zu einem verzögerten retrograden Zelltod führt (Beerkelaar et al., 1994). Die Zellquantifizierung ergab, dass die Zelldichte der re-axotomierten RGZ nicht mehr signifikant abnahm, egal ob 4 Tage ($177 \pm 68/\text{mm}^2$, $n = 5$), 7 Tage ($175 \pm 34/\text{mm}^2$, $n = 3$), 14 Tage ($160 \pm 20/\text{mm}^2$, $n = 4$) oder 28 Tage ($152 \pm 25/\text{mm}^2$, $n = 3$) seit der zweiten Verletzung vergingen ($p \leq 0,05$, Vergl. Abb. 18, 19).

Bis zu 14 Tagen nach der Re-Axotomie konnten nahezu keine fluoreszierenden Mikrogliazellen gefunden werden. Sehr wenige Zellen mit mikroglialer Gestalt (14 ± 6 , $n = 3$) konnten erst nach 28 Tagen detektiert werden. Dies deutet beispielsweise auf die Phagozytose einzelner Ganglienzellen hin (Vergl. Abb. 18, 19).

Zum Vergleich wurde eine Zellquantifizierung 28 Tage nach erster (Sehnerv-) Axotomie durchgeführt. In diesem Fall überlebten signifikant weniger RGZ ($78 \pm 27/\text{mm}^2$, $n = 3$, $p \leq 0,05$), dafür wurden verhältnismäßig viel mehr transzellulär gefärbte Mikrogliazellen registriert ($720 \pm 52/\text{mm}^2$, $n = 3$, $p \leq 0,001$) (Vergl. Abb. 18 u. 20).

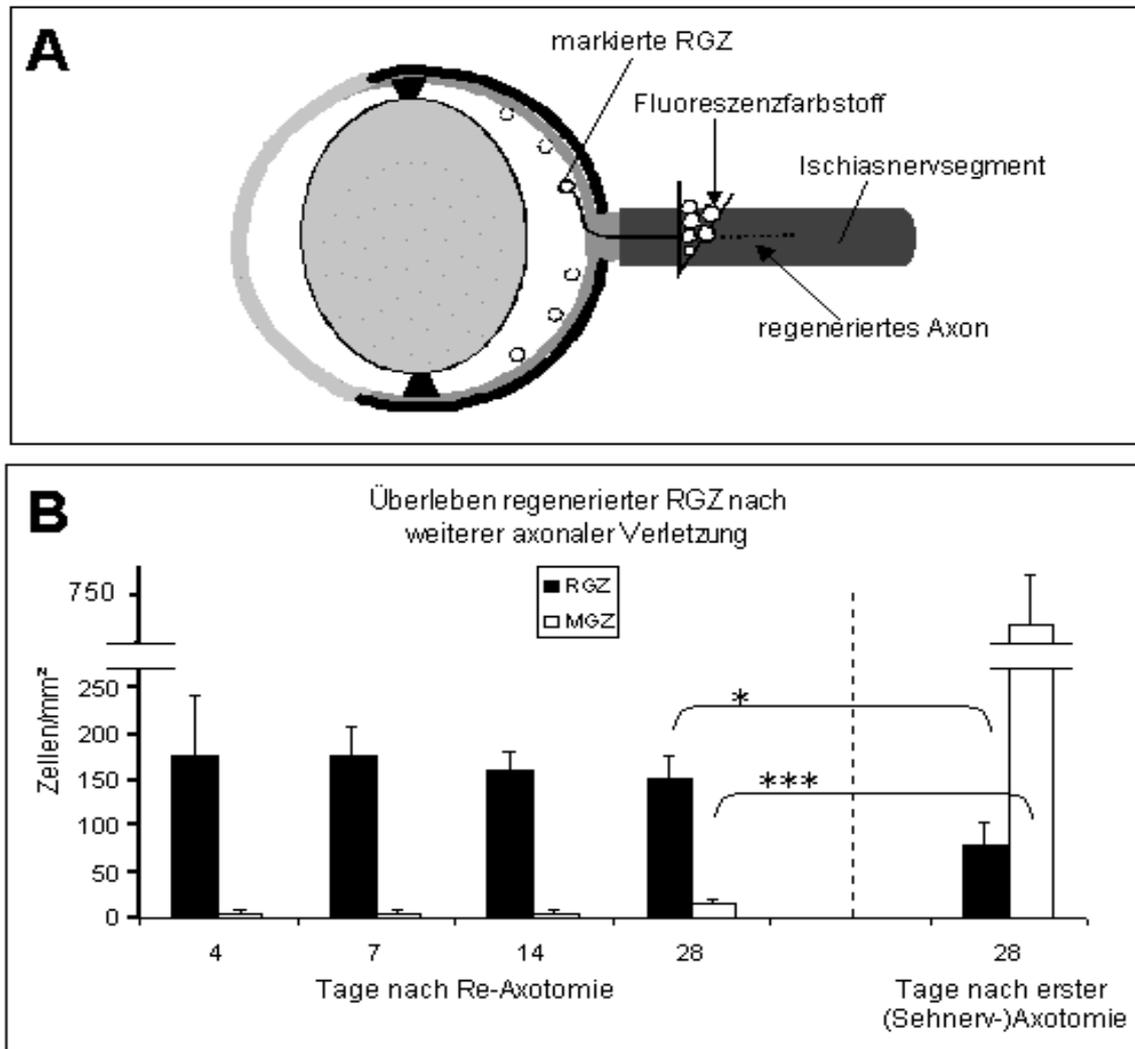


Abb. 18 Regenerierte RGZ zeigen verstärktes Überleben nach weiterer axonaler Verletzung

A. Schematische Darstellung der Re-Axotomie und retrograden Markierung regenerierter RGZ.

B. Bis mindestens 28 Tage nach Re-Axotomie von regenerierten RGZ kommt es zu keinem signifikanten Zellverlust in der Retina ($p \leq 0,05$). Im Vergleich dazu überleben im selben Zeitraum nach erster Axotomie signifikant weniger RGZ ($p \leq 0,05$), während wesentlich mehr Mikrogliazellen (MGZ) als Indikator der Ganglienzellphagocytose registriert werden ($p \leq 0,001$).

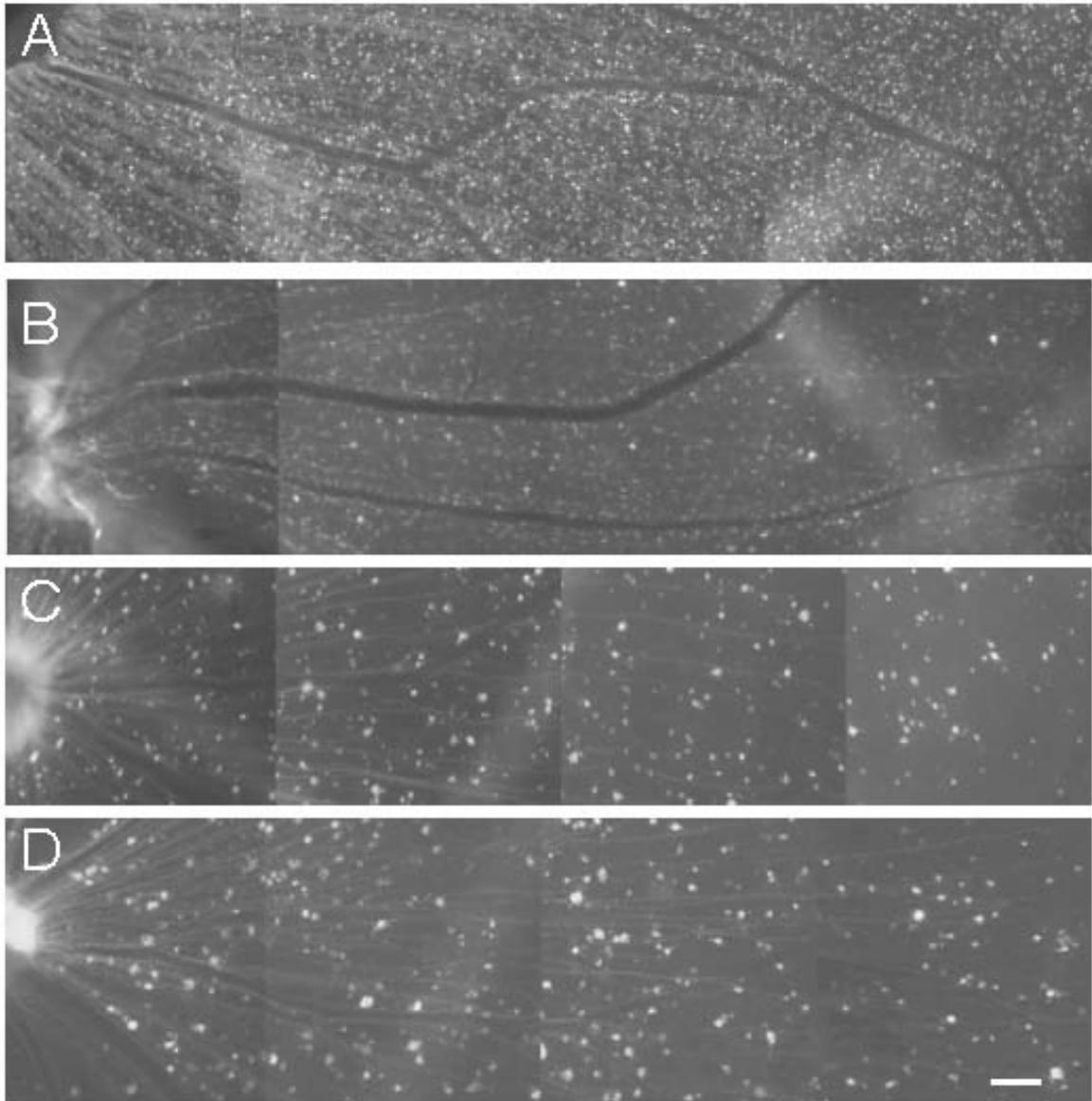


Abb. 19 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Ganzpräparate (*whole-mounts*) nach unterschiedlicher Behandlung (in Aufsicht)

A und B. Dargestellt ist hier der Zellverlust von normalen RGZ, der nach Axotomie des Sehnerven auftritt. Dazu wurden die RGZ nach intraorbitaler Axotomie retrograd markiert und nach **A) 4 Tagen** und **B) 28 Tagen** von der Papille (jeweils links) zur Peripherie hin aufgenommen.

C und D. Hier wird der ausbleibende Zellverlust regenerierter RGZ nach deren Re-Axotomie illustriert. Die regenerierten Axone wurden dafür im Transplantat durchtrennt und die Zellkörper von dort aus retrograd markiert. Anschließend erfolgte wieder die Aufnahme nach **C) 4 Tagen** und **D) 28 Tagen**. Maßstab = 100 μM

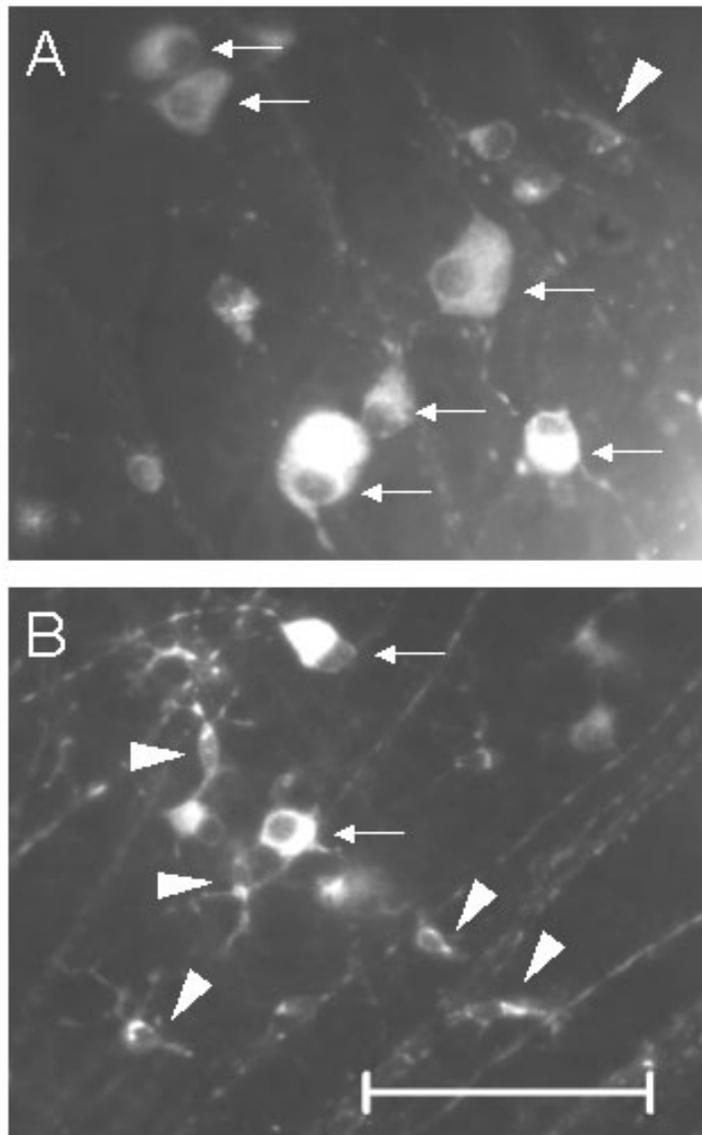


Abb. 20 Inversion des Ganglienzellen/Mikroglia-Verhältnisses nach Re-Axotomie (Detailliertere fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler *whole-mounts*)

A. Repräsentative Zone einer Retina 28 Tage nach Re-Axotomie und retrograder Markierung regenerierter RGZ. Es findet sich nur eine fluoreszierende Zelle mit mikroglialer Morphologie (Pfeilspitze) neben markierten RGZ (Pfeile). **B.** Repräsentative Zone einer Retina 28 Tage nach erster Axotomie und retrograder Ganglienzellmarkierung. Es sind wesentlich mehr durch Phagozytose markierte Mikrogliazellen (Pfeilspitzen) als Ganglienzellen selbst (Pfeile) registrierbar. Maßstab = 50 μM

3.4.1.2. Re-Axotomie im Sehnerven

Wenn die zweite Axotomie der RGZ im zentralnervösen Teil der Optikus-Ischias-Anastomose durchgeführt wird, kommt es wieder zu einer Separation der RGZ von den protektiven Schwann'schen Zellen. Somit kann festgestellt werden, ob die eben beobachtete verstärkte Überlebenstendenz der regenerierten RGZ nach Re-Axotomie wieder verloren gehen kann. Dazu wurde der Sehnerversatz durch ein Ischiassegment nicht wie sonst ca. 0,5 mm, sondern 3 mm vom Bulbus intraorbital durchgeführt. Auf diese Weise verblieb im Sehnervstumpf genug Platz, um die Re-Axotomie und retrograde Markierung der überlebenden RGZ von dort aus durchzuführen (Vergl. Abb. 21). Die Zellquantifizierung in der Retina erfolgte 4 und 14 Tage nach der zweiten Verletzung.

Nach 4 Tagen konnten hier 187 ± 42 RGZ/mm² (n = 3) markiert werden. Das entspricht in etwa der Menge, die sich 4 Tage nach Re-Axotomie vom Transplantat färben läßt. Mikrogliazellen konnten zu dieser Zeit noch nicht detektiert werden. 14 Tage nach der Re-Axotomie im Sehnervbereich konnten jedoch nur noch 95 ± 39 RGZ/mm² (n = 3, $\alpha \leq 0,05$) erfaßt werden. Dafür ließen sich 43 ± 22 MGZ/mm² (n = 3, $\alpha \leq 0,05$) nachweisen, die fluoreszierende Zelltrümmer phagocytiert hatten (Vergl. Abb. 21). Somit steht fest, dass die RGZ, die aufgrund des Transplantates regeneriert sind oder einfach nur überlebt haben, nach Entzug der Schwann'schen Zellen wieder absterben und mikroglial phagocytiert werden.

In diesem Zusammenhang konnte auch der Frage nachgegangen werden, ob die Mikrogliazellen, die RGZ nach der ersten Sehnervaxotomie phagocytieren, diesselben sind, die auch regenerierte Zellen nach Re-Axotomie wieder angreifen. Dazu wurde im Rahmen einer Doppelfärbung wie folgt vorgegangen (n = 1; Vergl. Abb. 22, oben): Der Sehnerv wurde 3 mm vom Bulbus durchtrennt und winzige Dil-Kristalle an der Schnittstelle plaziert. Danach wurde das Ischiassegment mit dem Sehnervrest verbunden. Auf diese Weise wurde ein Großteil der RGZ retrograd rot markiert. Da mehr als 80 % der RGZ beim Transplantationsvorgang absterben, gingen die roten Dil-Partikel somit in Mikrogliazellen über. Zwei Wochen nach der Transplantation wurden die regenerierten bzw. überlebenden RGZ im Sehnervstumpf re-axotomiert und dabei mit Di-Asp retrograd markiert. Als wiederum 2 Wochen später die Retina ausgewertet wurde, fanden sich Mikrogliazellen, die sowohl Dil- als auch Di-Asp-positiv waren und somit mehrmals hintereinander RGZ phagocytiert hatten (Vergl. Abb. 22, unten).

Die Doppelfärbung beruht darauf, dass die Fluoreszenz von Dil am stärksten im TRITC-Filter, die von Di-Asp jedoch am stärksten in FITC-Filter detektiert werden kann (Vergl. Abb. 22, unten).

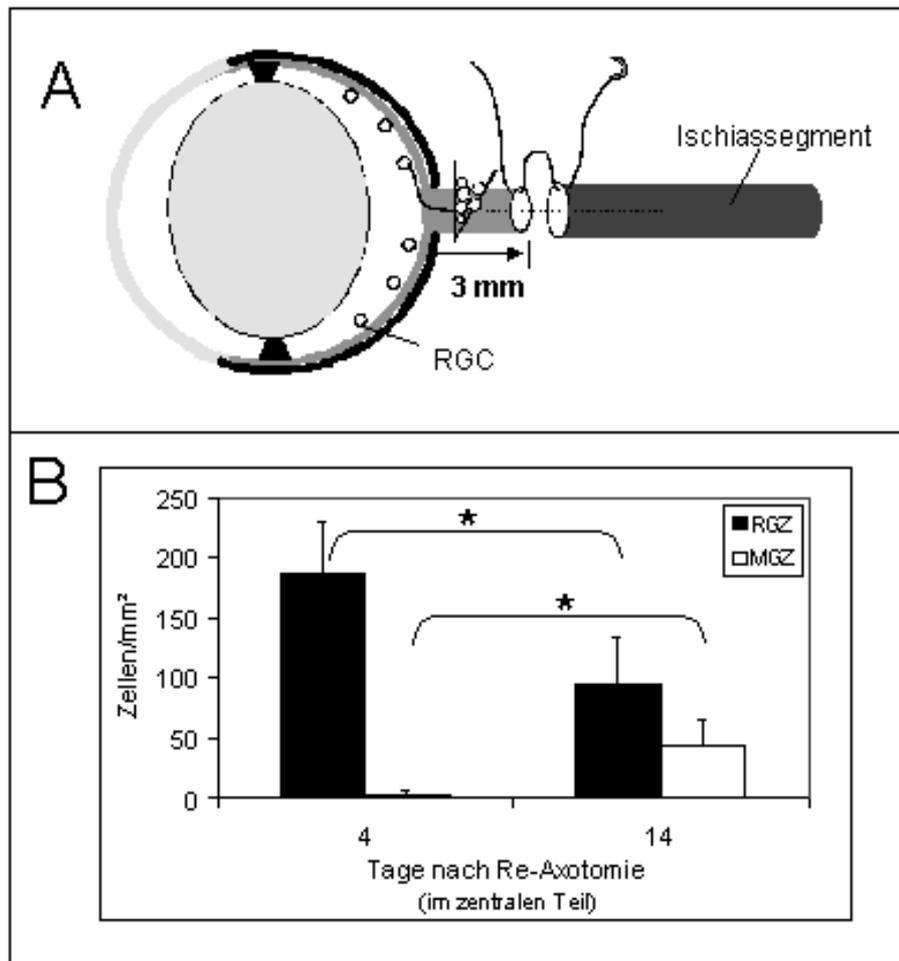


Abb. 21 Re-Axotomie von RGZ im Sehnervbereich führt wieder zu retrograden Zelltod

A. Nach distalerem Sehnerversatz durch ein Ischiassegment ist die Re-Axotomie und retrograde Markierung von regenerierten bzw. überlebenden RGZ in zentralnervöser Umgebung möglich.

B. Die hierdurch erzwungene Separation der RGZ-Axone von Schwann'schen Zellen des Transplantates führt wieder zu signifikantem Absterben bzw. mikroglialer Phagozytose.

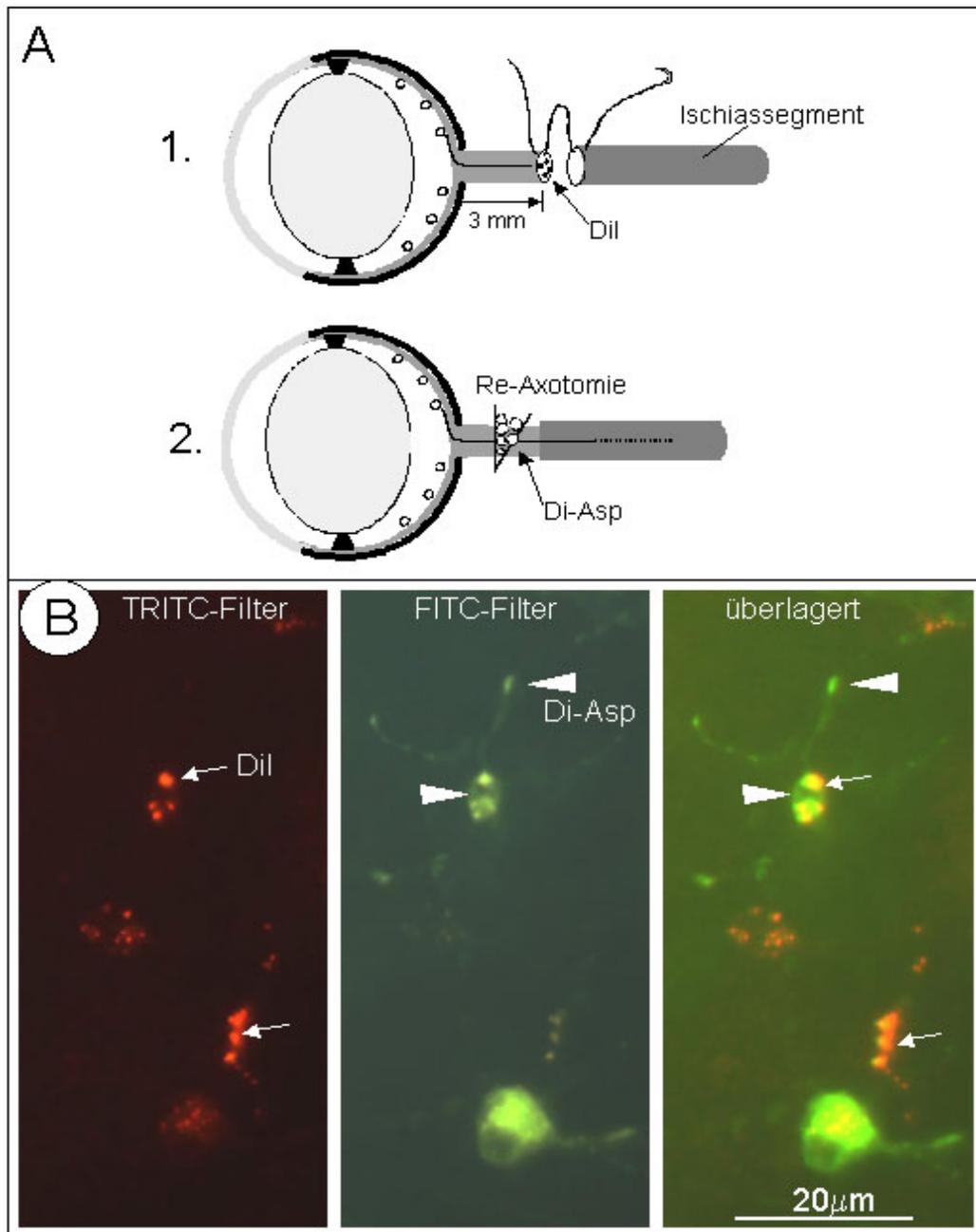


Abb. 22 Nachweis der mehrmaligen Phagozytosefähigkeit von Mikrogliazellen

A. Experimentelle Vorgehensweise. Zunächst erfolgen Sehnervaxotomie, Platzierung von Dil-Kristallen und Transplantation, zwei Wochen später dann Re-Axotomie überlebender RGZ in zentralnervöser Umgebung und Di-Asp- Markierung. Wiederum zwei Wochen später wird die Auswertung durchgeführt. **B (links, Aufnahme im TRITC-Filter).** Da ein Großteil der RGZ zwei Wochen nach der Transplantation abstirbt, entsehen durch deren Phagozytose Dil-positive MGZ (Pfeile). **Mitte (FITC-Filter):** Werden überlebende RGZ zwei Wochen nach der Transplantation im Sehnervstumpf re-axotomiert und mit Di-Asp gefärbt, gehen auch deren Zelltrümmer in MGZ über und markieren sie grün (Pfeilspitzen). **Rechts (überlagerte Aufnahmen):** Die obere MGZ ist Dil- und Di-Asp- positiv und hat somit mehrmals hintereinander Neurone phagozytiert, während die untere bisher nur nach der ersten Axotomie phagozytoseaktiv war.

3.4.2. Stabilisierung regenerierter RGZ durch Umleitung der Axone in periphere Innervationsgebiete (quergestreifte Muskulatur)

Die Aufgabe von Motoneuronen besteht darin, elektrische Signale über spezielle neuromuskuläre Synapsen auf Fasern der quergestreifte Muskulatur zu übertragen. Dadurch wird die Muskulatur zur Kontraktion veranlaßt und letztlich die Ausführung bewußt oder reflektorisch gesteuerter Bewegungsabläufe ermöglicht.

Im folgenden Teil dieser Arbeit soll herausgearbeitet werden, ob die Innervation von quergestreifter Muskulatur auch durch regenerierende, sensorische ZNS-Neurone aus neuroanatomisch-histologischer Sicht möglich ist. Dazu wurde chirurgisch eine neuromuskuläre Übergangszone hergestellt, bei der regenerierende RGZ-Axone mit der quergestreiften Kaumuskulatur als Zielgewebe konfrontiert wurden. Falls durch das Ischiassegment regenerierte RGZ peripher-neuronale Eigenschaften gewinnen, wurde erwartet, dass deren Axone in das muskuläre Gewebe hineinwachsen können. Zumindest aber sollte keine repulsive Wirkung auftreten.

Die Auswertung sollte zum einen durch immunhistochemische Analyse der neuromuskulären Übergangszone erfolgen (Vergl. Abb. 23). Als Kontrollexperiment wurde außerdem eine retrograde Markierung von RGZ über eventuell eingewachsene Axone von der Muskulatur aus durchgeführt.

3.4.2.1. Immunhistochemische Analyse der neuromuskulären Übergangszone

Zunächst wurden von den präparierten Übergangszonen (n = 3) Kryostatschnitte erstellt. Als Marker zur Visualisierung der regenerierenden Axone wurde Neurofilament verwendet. Es stellte sich heraus, dass bei starker Vergrößerung neben den Axonen auch die charakteristische Mikromorphologie der quergestreiften Muskelfasern dargestellt werden konnte. Auf diese Weise konnte bei der Färbung exakt zwischen neuronalem und muskulärem Gewebe unterschieden werden (Vergl. Abb. 24, 25).

Im Transplantatbereich waren regenerierende Axone sowie deren parallele Wachstumsrichtung klar erkennbar. Es zeigte sich weiter, dass diejenigen Axone, deren Wachstumsachse parallel zur muskulären Mikrostruktur verlief, 500 – 600 μM in das muskuläre Gewebe einwachsen konnten (Vergl. Abb. 24). Detailliertere Aufnahmen belegen, dass die axonale Wachstumsrichtung immer parallel zu den Myofibrillenbündel, nie aber quer dazu verlief (Vergl. Abb. 25). Für die Innervation eines Muskels ist dessen Invasion durch Axone eine einfache neuroanatomische Voraussetzung.

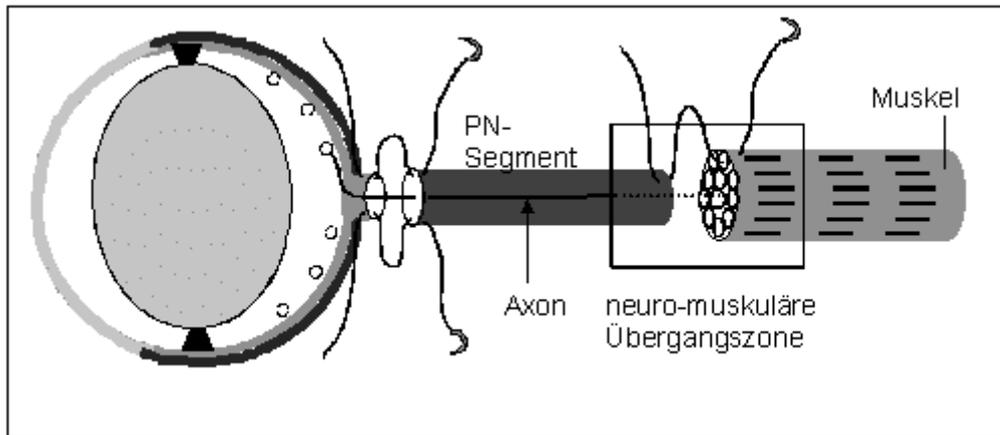


Abb. 23 Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise

Die artifiziell geschaffene neuromuskuläre Übergangszone wird zunächst prepariert und dann einer immunhistochemischen Färbung gegen Neurofilament unterzogen.

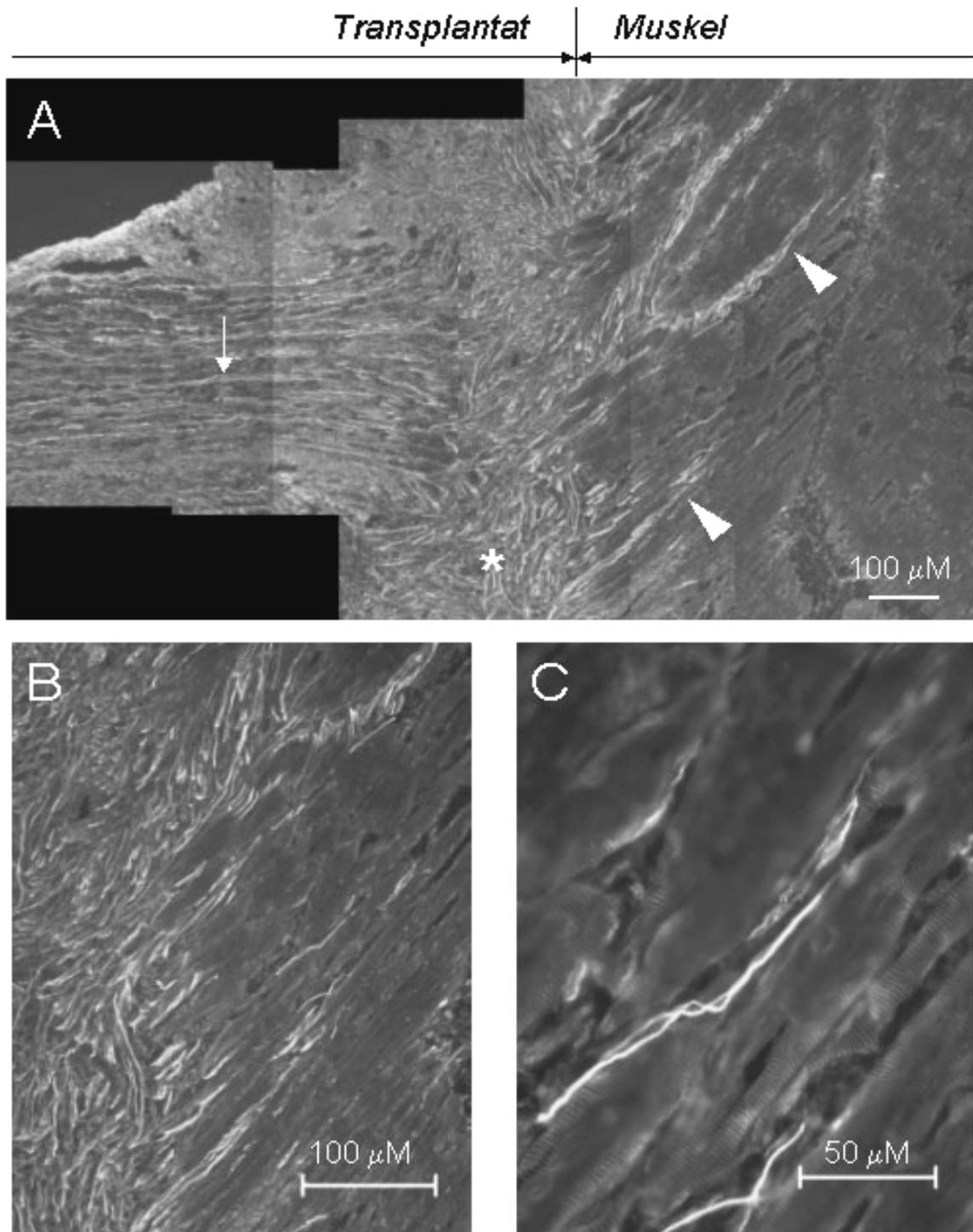


Abb. 24 Immunhistochemische Inspektion der neuromuskulären Übergangszone

Durch die Neurofilamentfärbung werden neuronale und muskuläre Strukturen klar unterscheidbar. **A.** In paralleler Richtung regenerierende RGZ-Axone aus dem Ischiassegment (Pfeil) werden beim Auftreffen auf die muskuläre Grenzfläche zunächst verwirbelt (Stern). Die Axone, deren Wachstumsachse parallel zur muskulären Mikrostruktur ausgerichtet ist, können mehrere 100 μM auf Muskelfasern weiterwachsen (Pfeilspitzen). **B** und **C.** Vergrößerte Aufnahmen der neuromuskulären Übergangszone.

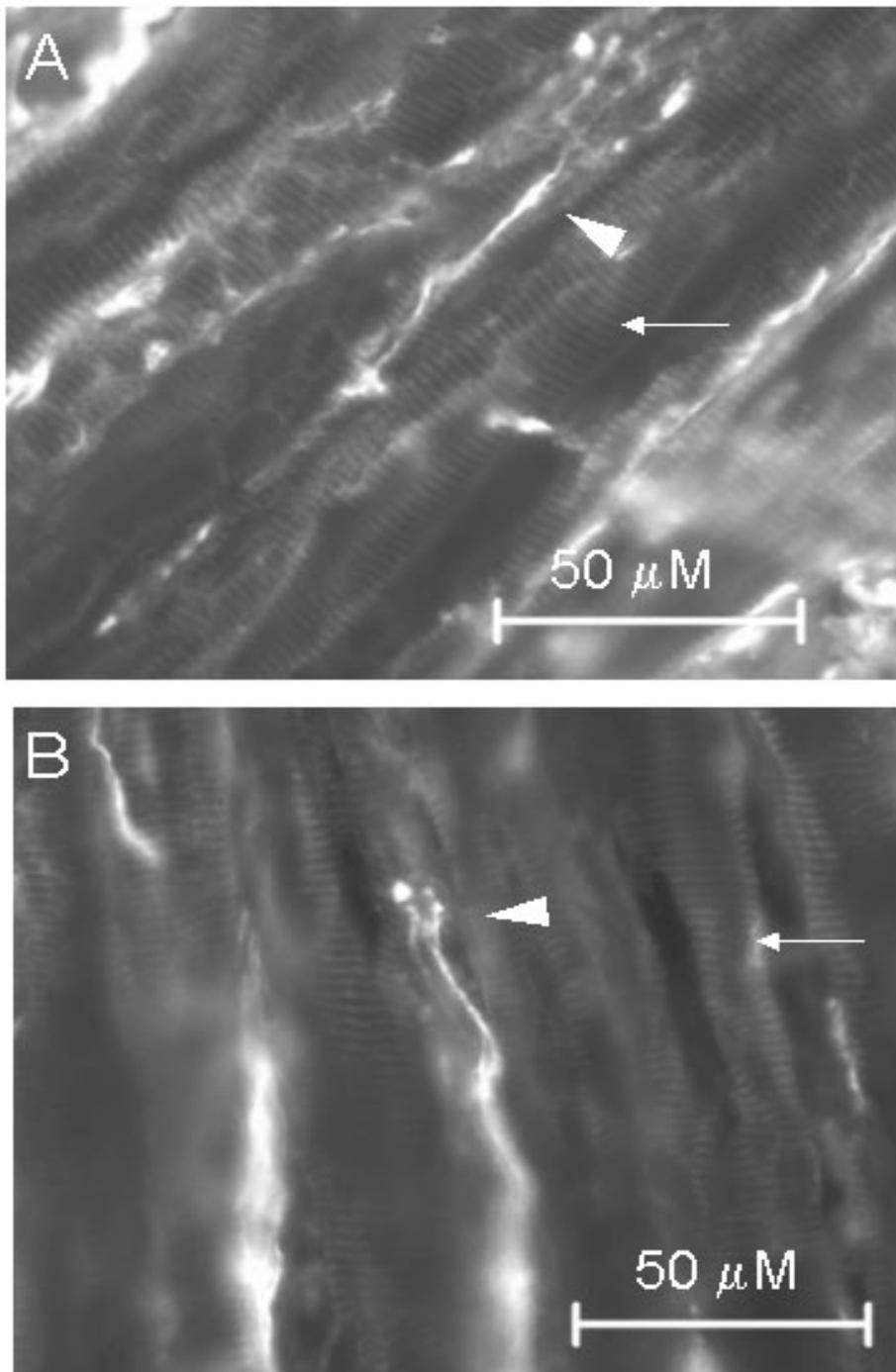


Abb. 25 Detaillierte Aufnahmen von ins Muskelgewebe eingewachsenen Axonen

Durch die Neurofilamentfärbung wird neben den Axonen auch die charakteristische muskuläre Mikromorphologie sichtbar, vermutlich durch Anfärbung von Aktinfilamenten (A, B; Pfeile).

A. Bei der markierten neuronalen Struktur (Pfeilspitze) handelt es sich um einen Wachstumskegel. B. Bei dieser Struktur (Pfeilspitze) könnte die terminale Verzweigung und Verdickung außer auf einen Wachstumskegel theoretisch auch auf eine synaptische Endigung hindeuten. Beide Aufnahmen belegen einen direkten Zusammenhang zwischen axonaler Wachstumsrichtung und Orientierung der Myofibrillenbündel.

3.4.2.2. Retrograde Markierung eingewachsener RGZ

Durch die retrograde Färbung von der Muskulatur aus soll nachgewiesen werden, dass es sich bei den eingewachsenen Neurofilament-positiven Fasern um Ganglienzellaxone handelt. Dazu wurden im Muskel, 1 – 2 mm unterhalb der neuromuskulären Verbindung, mit einem spitzen Skalpell feine Inzisionen gesetzt und die Di-Asp-Kristalle dorthinein platziert. Dabei wurde in Kauf genommen, dass nur die Axone dem Farbstoff ausgesetzt wurden, die relativ weit ins Muskelgewebe eingewachsen waren und deren Anzahl von daher wahrscheinlich gering war (Vergl. Abb. 26).

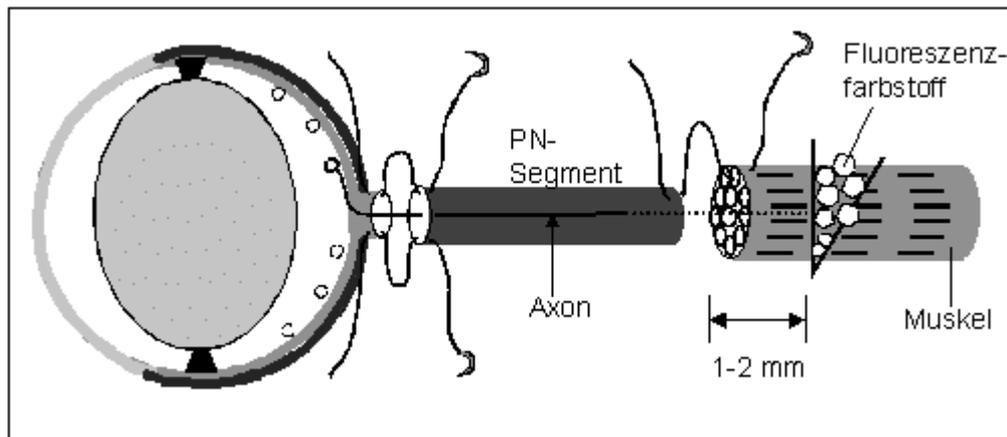


Abb. 26 Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise

Die möglichst selektive Markierung der RGZ mit ins Muskelgewebe eingewachsenen Axonen erfolgt im angegebenen Abstand hinter der neuromuskulären Verbindung.

Die Quantifizierung der so markierten RGZ wurde 7 Tage nach der Färbung durchgeführt und ergab 110 ± 40 RGZ pro Retina ($n = 3$). Wenn man einen retinalen Oberflächenanteil von 50 mm^2 zugrundelegt, so ergäbe dies 7 Tage nach der retrograden Markierung der RGZ vom Transplantat aus 8750 ± 1700 RGZ pro Retina ($n = 3$; Vergl. 3.3.1.). Somit wären die Axone von $1,25 \pm 0,4 \%$ der gesamten regenerierten RGZ-Population vom Transplantat ins Muskelgewebe übergetreten (Vergl. Abb. 27). Dies scheint im Hinblick auf die immunhistochemische Auswertung auch zutreffend, da auch hier nur ein kleiner Teil der Axone übertrat.

Die vom Muskel aus markierbaren RGZ zeigten eine relativ einheitliche Morphologie. Sie waren überwiegend mit einem hexagonalen Zellkörper und meist 4 primären Dendriten ausgestattet. Für eine genaue Klassifizierung schien die Farbstoffbefüllung der Zellen allerdings nicht ausreichend zu sein (Vergl. Abb. 28).

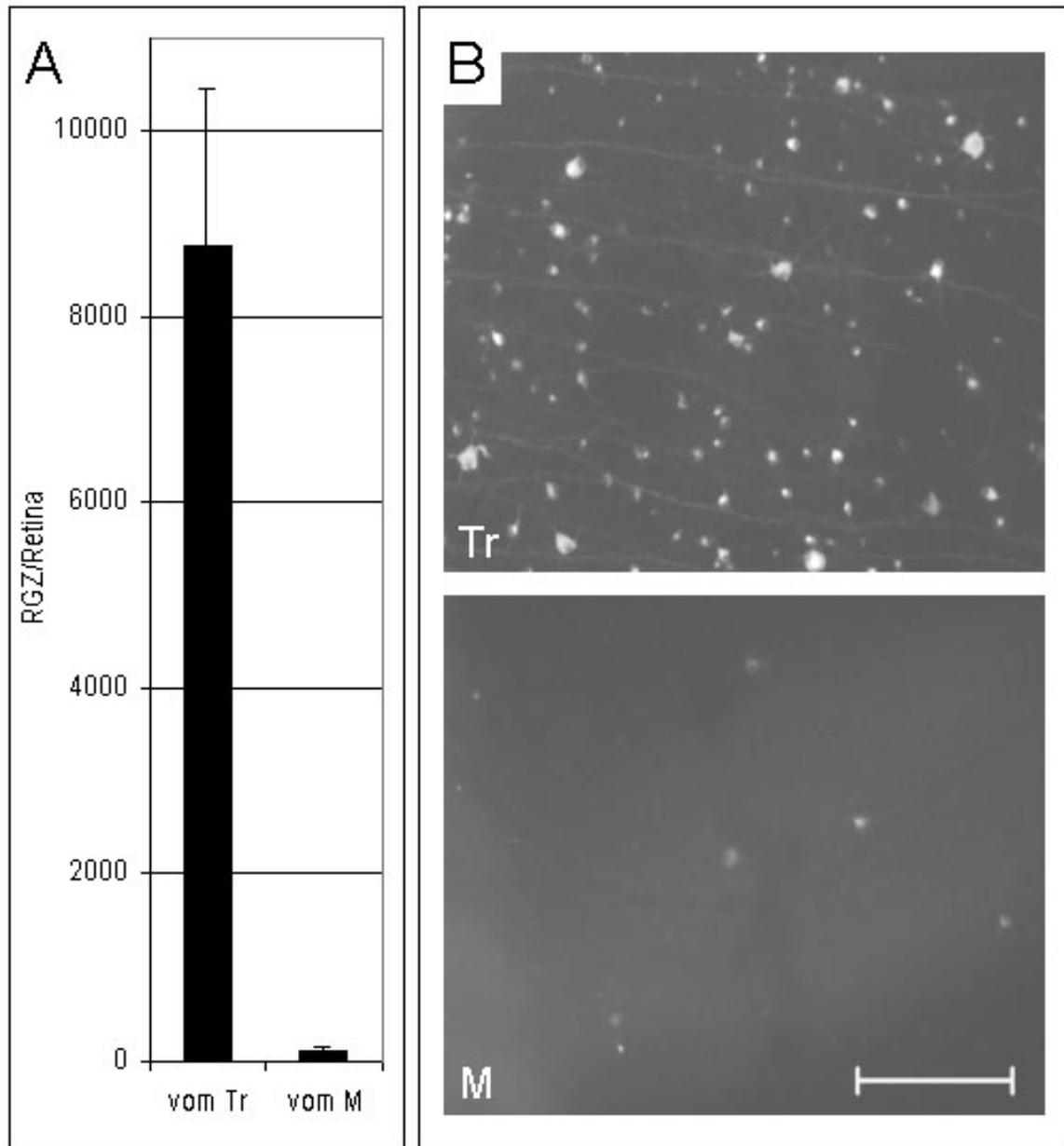


Abb. 27 Gegenüberstellung der vom Transplantat und Muskel aus retrograd markierbaren RGZ-Populationen,.

A. Die Ganglienzellmenge, deren Zellkörper vom Muskel aus mit Di-Asp anfärbbar sind, beträgt ca. 1,25 % der vom Transplantat aus darstellbaren gesamten regenerierten Population. Dazu wurde eine retinale Oberfläche von 50 mm² zugrundegelegt und die RGZ-Menge, die nach 7 Tagen vom Transplantat pro mm² markiert werden kann, auf diese Fläche hochgerechnet.

B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Verdeutlichung der unterschiedlich großen darstellbaren RGZ-Mengen. Abkürzungen: Tr Transplantat; M: Muskel. Maßstab 100 µm

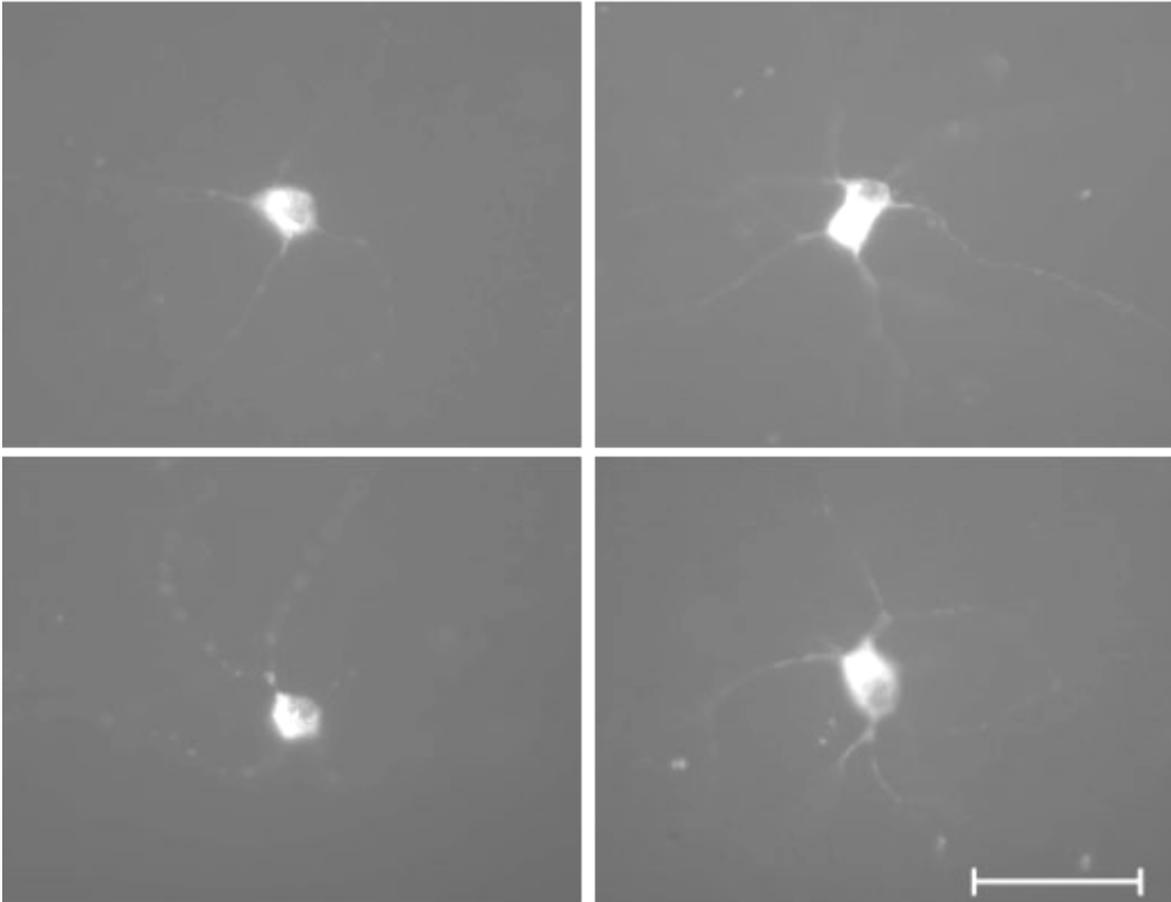


Abb. 28 Markierte RGZ-Zellkörper in der Retina

Sieben Tage nach der retrograden Markierung vom Muskel aus finden sich in der Retina Ganglienzellen mit überwiegend einheitlicher Morphologie. Für eine stärkere Farbstoffbefüllung der Zellen, insbesondere der dendritischen Felder, war die Transportzeit des Farbstoffes offensichtlich nicht ausreichend. Versuche mit längerer Transportzeit für den Farbstoff wurden nicht durchgeführt. Maßstab 50 μM

3.4.3. Expressionsanalyse des Neurotransmitterenzym Cholinacetyltransferase

Acetylcholin ist der Neurotransmitter des peripheren Nervensystems, der insbesondere an neuromuskulären Synapsen als Signalüberträger fungiert. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym zur Synthese von Acetylcholin ist Cholinacetyltransferase (ChAT), welches im Soma cholinergischer Nervenzellen wie z.B. Motoneuronen exprimiert wird. Cholinerge Neurone sind dabei nicht nur im peripheren, sondern auch im zentralen Nervensystem und auch in der Retina verbreitet. Durch frühere Studien konnten ChAT-exprimierende Neurone in der Retina als amakrine Zellen identifiziert werden und werden auch cholinozeptive *starburst*-Zellen genannt (Masland und Tauchi, 1986). Amakrine Neurone sind innerhalb der Retina in relativ regelmäßigen Abständen in der Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht lokalisiert (Vaney 1990, für Übersicht) und führen bestimmte Funktionen in der Signalmodifikation aus, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die bisherigen Ergebnisse (3.4.1.) deuten darauf hin, dass regenerierende RGZ Eigenschaften gewinnen, die peripheren Neuronen wie z.B. Motoneuronen ähnlich sind. Aus diesem Grund soll überprüft werden, ob regenerierte RGZ auch im Hinblick auf Neurotransmittersynthese peripher-neuronale Eigenschaften annehmen. Dazu wurden die retinale ChAT-Expression in unbehandelten und regenerierten Retinae immunhistochemisch und durch *Western blot* bestimmt. Da bei der ChAT-Färbung von Querschnitten unbehandelter Retinae nicht nur cholinerge, sondern unspezifisch auch andere Neurone gefärbt wurden, wurde die ChAT-Immunhistochemie an retinalen Ganzpräparaten (*whole-mounts*) durchgeführt.

Immunhistochemisch (n = 3) zeigten sich sowohl in unbehandelten als auch in regenerierten Retinae ChAT-positive amakrine Neurone, die anhand ihrer Zelldichte auf der Retina identifiziert werden können (Vergl. Abb. 29). Das regenerierte RGZ auch ChAT exprimierten, war von daher unwahrscheinlich, dass die Dichte ChAT-positiver Zellen in regenerierten Retinae rein optisch nicht erhöht war (Vergl. Abb. 29). Letzten Aufschluß darüber könnte allerdings nur eine ChAT-Färbung der Retina mit ganglienzellspezifischer Doppelfärbung bringen, über die im nächsten Abschnitt berichtet wird. Im *Western blot* (n = 3) waren die ChAT-Levels von regenerierten Retinae auch nicht wesentlich gegenüber unbehandelten erhöht, auch dann nicht, wenn eine Umleitung der Axone in quergestreifte Muskulatur vorgenommen wurde (Vergl. Abb. 29).

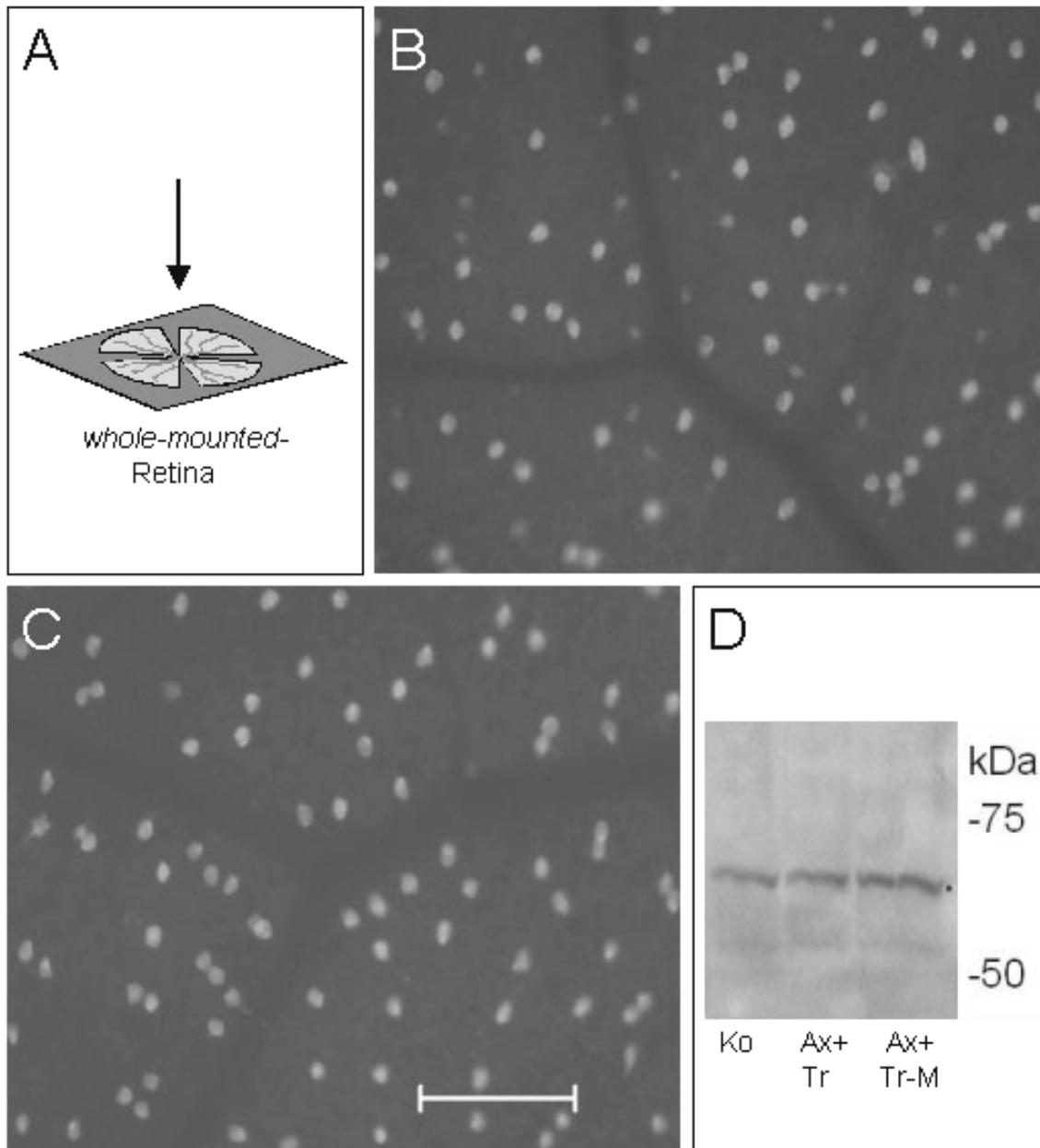


Abb. 29 Analyse der retinalen Cholinacetyltransferase (ChAT)-Expression

A. Schematische Ansicht und Blickrichtung auf die in diesem Versuch immunhistochemisch gefärbten ausgebreiteten Retina. B. Oberfläche einer unbehandelten Retina und C. einer Retina mit axonaler Regeneration (bis hin zum Muskelgewebe) nach ChAT-Färbung und Darstellung cholinergischer amakriner Neurone. Es sind keine wesentlichen Unterschiede in der reinen Zelldichte- und Größe zu erkennen. Maßstab = 100 μ m. D. *Western blot*-Analyse der retinalen ChAT-Expression: Ko = unbehandelt; Ax+Tr = regeneriert; Ax+Tr-M = regeneriert mit ins Muskelgewebe umgeleiteten RGZ-Axonon. Auch hier zeigen sich keine substantiellen Unterschiede.

Neuroanatomisch-immunchemische Kombinationsfärbung: Durch diese Methodik kann die Expression von nennenswerten Mengen ChAT in regenerierten RGZ eindeutig bestimmt bzw. ausgeschlossen werden. Dafür wurden die regenerierten RGZ nach ausreichendem Wachstum ins Transplantat mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil retrograd markiert. Wie bereits unter 3.4.1.2. beschrieben, läßt sich das Fluoreszenzlicht dieses Farbstoffes im Gegensatz zu dem von Di-Asp stärker im roten und weniger im grünen Bereich detektieren. Deswegen eignet sich Dil auch für Doppelfärbungen mit Fluoresceinderivaten wie z.B. FITC, welche häufig als Antikörperkonjugate Verwendung finden und deren Fluoreszenzmaximum im grünen Bereich liegt.

Die Retinae mit Dil-markierten Ganglienzellen wurden nach Dissektion als *whole-mount*-Präparat immunhistochemisch gegen ChAT gefärbt. Die Lokalisierung dieses Antikörpers wurde mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper visualisiert. Eine Colokalisation von Dil- Fluoreszenz und ChAT- Immunreaktivität konnte für sowohl für normale (n = 1; nicht dargestellt) als auch regenerierte RGZ (n = 1) erwartungsgemäß nicht gezeigt werden (Vergl. Abb. 30). Eine *de novo*-Expression von ChAT findet in RGZ nach Regeneration in ein peripheres Nerven­transplantat nicht statt. Aufgrund der Ergebnisse des letzten Abschnittes ist eine ChAT- Expression auch dann unwahrscheinlich, wenn die Axone der RGZ in quergestreifte Muskulatur umgeleitet werden (Vergl. Abb. 29).

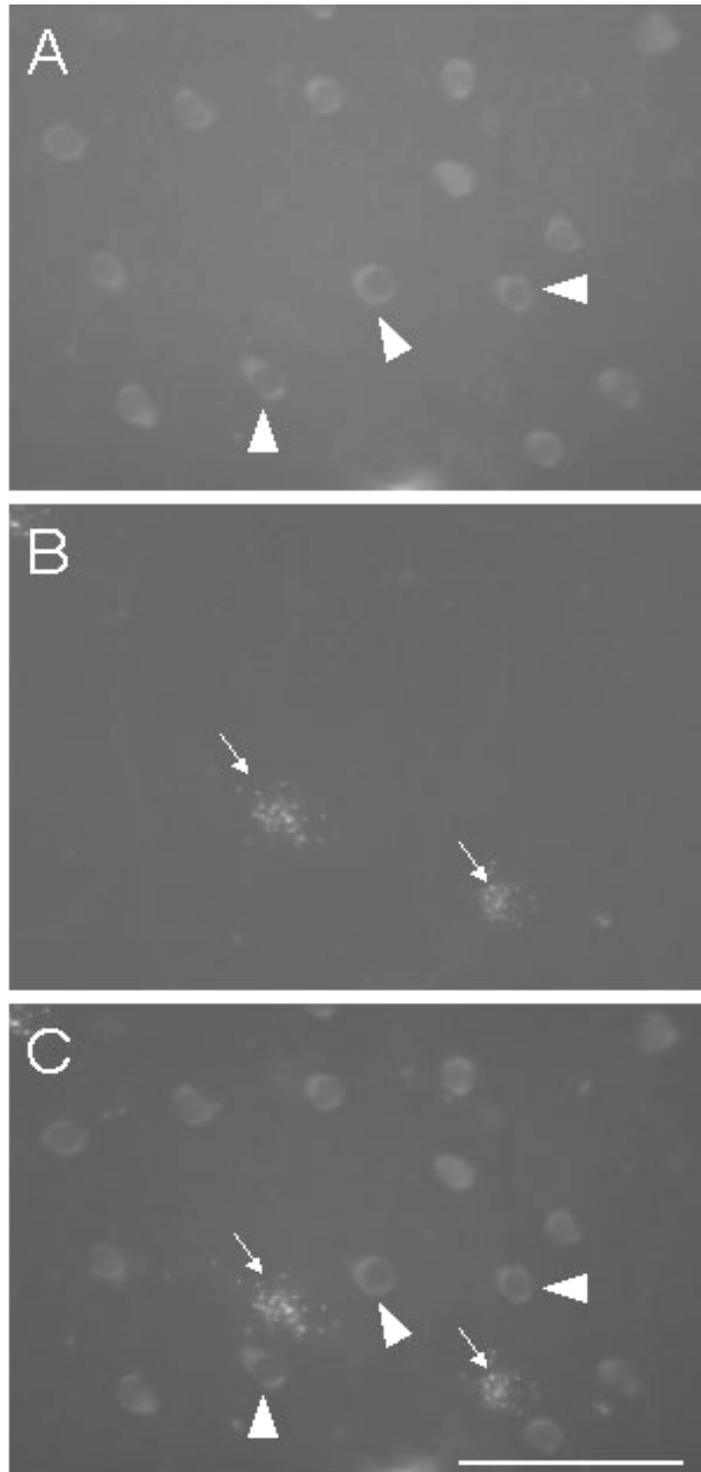


Abb. 30 Neuroanatomisch-immunhistochemische Doppelfärbung zum Ausschluß einer ChAT-Expression durch regenerierte RGZ (in retinalen *whole-mounts*)

A. Darstellung ChAT-positiver amakriner Neurone (Pfeilspitzen) im FITC- Filter. B. Visualisierung von mit Dil markierten regenerierten RGZ im TRITC- Filter (Pfeile). C. Überlagerung von A) und B) und Ausschluß der Colokalisation. Maßstab = 50 μ M

Pro	Contra
Gliale Myelinisierung der Axone durch Schwann'sche Zellen	Keine Expression des peripher-neuronalen Transmitterenzym ChAT
Ausbleibender Zelltod nach Re-Axotomie im Transplantat	
Axonale Invasion in peripher-neuronale Zielgewebe	

Tabelle 2 Eigenschaften von regenerierten RGZ im Hinblick auf das Erlangen peripher-neuronaler Charakteristika

Gegenübergestellt sind hier bereits bekannte und neuartige Eigenschaften von RGZ, deren Axone in peripher-neuronalem Milieu regenerieren konnten. Die linke Seite spricht für, die rechte gegen eine „Peripherisierung“.

4. Diskussion

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war

- A) ob der Ersatz des Sehnerven durch ein peripheres Nervensegment regenerationsspezifische biochemische Auswirkungen in der Retina hervorruft und
- B) inwieweit regenerierende RGZ dadurch peripher-neuronale Eigenschaften annehmen.

Bevor die Ergebnisse einer Diskussion unterzogen werden, sollen diese zunächst zusammenfassend dargestellt werden:

- 1) Die Expression der astroglialen Proteine GFAP und Bcl-2 ist in regenerierten Retinae stärker als in solchen nach Sehnervaxotomie alleine oder ohne Behandlung. Die Regeneration von RGZ ist offensichtlich mit einer speziellen Beteiligung von retinalen Müllerzellen verbunden.
- 2) Die Expression von normalerweise lentalem β -Kristallin und stressinduzierbarem Hsp27 in der neuralen Retina verändert sich sowohl nach Axotomie als auch nach axonaler Regeneration von RGZ. Hsp27 wird durch Axotomie induziert, während die Expression von β -Kristallin dann zurückgeht. Nach Regeneration nähert sich die Expression beider wieder der Ausgangssituation an.
- 3) Re-Axotomie von regenerierten RGZ innerhalb des Transplantates führt nicht zu signifikantem retrogradem Zelltod für wenigstens 28 Tage. Damit einhergehend ist auch die mikrogliale Phagozytose extrem reduziert.
- 4) Bei Kontakt von regenerierten RGZ-Axonon mit quergestreifter Muskulatur als peripherem Zielgewebe findet eine axonale Invasion über mehrere 100 μm statt, die von der Ausrichtung der muskulären Mikrostruktur abhängt.
- 5) RGZ, deren Axone in peripheres Nervengewebe regenerieren, zeigen keine immunchemisch messbare Expression des peripher-neuronalen Transmitterenzym Cholinacetyltransferase.

4.1. Biochemisch meßbare Veränderungen in retinalen Neuronen

4.1.1. Rolle von Hsp27

Wie bereits angedeutet, gehören Hitzeschockproteine zu einer hochkonservierten Molekülgruppe, die auch in prokaryontischen Zellen vorkommen und bezüglich ihrer molekularen Masse und Aminosäurehomologie familiär einteilbar sind (Welch, 1992, für Übersicht). Diese Proteine werden konstitutiv nur in wenigen Zelltypen exprimiert und zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch physikalische, mechanische oder metabolische Stressoren induziert werden können (Morimoto et al., 1992, für Übersicht). Aufgrund der Fähigkeit von Hitzeschockproteinen, bei Stresseinwirkung andere cytoplasmatische Proteine unspezifisch vor Aggregation zu schützen, werden ihnen cytoprotektive Funktionen zugeordnet (Merck et al., 1993). Für die Erforschung neuronaler De- und Regeneration ist insbesondere Hsp27 von Interesse, da für diesen Vertreter bei Überexpression in kultivierten Neuronen bereits antiapoptotische Effekte gezeigt werden konnten, so z.B. bei Neurotrophinentzug oder Einwirkung proapoptotischer Agentien (Wagstaff et al., 1999). Passend dazu fand man im Serum von Patienten mit glaukomatöser retinaler Neurodegeneration Antikörper gegen Hsp27 (Tezel et al., 1998). Wenn kultivierte Retinae diesem Antikörper ausgesetzt wurden, kam es zur Apoptose von Ganglienzellen, was ebenso ein inhibitorisches eingreifen von Hsp27 in die apoptotische Kaskade nahe legt (Tezel und Wax, 2000).

Bei Kenntnis der genannten Eigenschaften von Hsp27 ist es somit zunächst nicht überraschend, dass sowohl in dieser als auch in anderen Arbeiten die Sehnervaxotomie Hsp27 in RGZ induziert (Krueger-Naug et al., 2002). Folglich wird dessen Expression Wochen später nur noch in den wenigen RGZ gefunden wird, welche die Axotomie überlebt haben (Krueger-Naug et al., 2002). Dies ist vereinbar mit dem Befund, dass nach Durchtrennung eines peripheren Nerven alle axotomierten und über längere Zeit überlebenden Neurone Hsp27-positiv waren (Lewis et al., 1999). Warum Hsp27 einer Vielzahl axotomierter peripherer Neurone, aber nur einzelnen axotomierten RGZ ein Langzeitüberleben ermöglicht, ist allerdings nach wie vor offen.

Dass nach Regeneration in ein Ischiassegment die Hsp27-Expression in RGZ nicht in dem Maße wie nach Axotomie auftritt, kann verständlich werden, wenn man intrazelluläre Wirkungen von Neurotrophinen berücksichtigt (Vergl. 1.2.2.). Durch den Kontakt der RGZ-Axone zu Schwann'schen Zellen findet eine retrograde Versorgung mit Neurotrophinen statt, die durch die Axotomie zuvor unterbrochen worden war. Die Wirkung der

neurotrophen Faktoren ist mit der Aufrechterhaltung eines wachstumsassoziierten Stoffwechsels und der Unterdrückung apoptotischer Signalwege verbunden. Bei den intrazellulären Signalkaskaden, die durch Neurotrophine in Gang gesetzt werden, treten außerdem Intermediate auf, die die Expression von Hsp27 verhindern, indem dafür zuständige Transkriptionsfaktoren deaktiviert werden (Chu et al., 1996). Somit wären regenerierte und damit unter Neurotrophineinfluß stehende RGZ nicht mehr ohne weiteres in der Lage, das Hsp27-Gen zu exprimieren. Der neurotrophinabhängige Überlebensweg wird offensichtlich gegenüber dem Hsp27-abhängigen bevorzugt.

Die hier vorgefundene retinale Hsp27-Expression und die mögliche Erklärung dafür findet Bestätigung in Studien, die methodisch völlig anders, im Ergebnis aber sehr ähnlich verlaufen sind. In Arbeiten von Krueger-Haug und Kollegen (2003) testete man, wie sich die intravitreale Verabreichung des Neurotrophins *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) auf die Expression von Hsp27 in axotomierten RGZ auswirkte. Man fand, dass die Zahl der überlebenden RGZ nach Axotomie stark gestiegen war, der Anteil der Hsp27-positiven RGZ aber im Vergleich zu Vehikelinjektionen stark reduziert war. Die reduzierte Fähigkeit, Hsp27 zu exprimieren, lag somit am Vorhandensein von BDNF. Wenn man davon ausgeht, dass im Transplantationsmodell auch Neurotrophine für reduzierte Hsp27-Expression verantwortlich waren, scheint es keine Rolle zu spielen, ob sie durch axonalen Transport oder Diffusion zu den RGZ gelangen.

Oben genannte Autoren (Krueger-Haug et al., 2003) folgern daraus, dass Neurotrophine alternative Überlebenswege, z.B. den Hsp27-abhängigen Weg, für verletzte ZNS-Neurone blockieren. Das würde ihrer Meinung nach die Tatsache erklären, dass das Überleben axotomierter RGZ trotz mehrmaliger Injektion von BDNF nur wenige Wochen vorhält. Hierbei sollte allerdings hinzugefügt werden, dass für eine Langzeitstabilisierung von verletzten Neuronen auch die Art der Neurotrophinverabreichung und die axonale Umgebung eine Rolle spielen. So führt der axonale Kontakt zu Schwann'schen Zellen und die retrograde Versorgung mit Neurotrophinen durchaus zu einem Langzeitüberleben von verletzten RGZ (Thanos und Mey, 1995).

4.1.2. Rolle von β -Kristallin

Bei Kristallinen handelt es sich um eine Familie wasserlöslicher Proteine, die bezüglich ihres abnehmenden Molekulargewichtes in Säugetieren in α -, β - und γ - Gruppen klassifiziert werden (Graw 1997, für Übersicht). Kristalline sind in erster Linie aus der Linse bekannt, deren Fasern sich zum großen Teil aus diesen Proteinen zusammensetzen. Die einwandfreie refraktive Funktion der Linse kann nur dann gewährleistet werden, wenn das Gewebe zeitlebens seine Transparenz beibehält. Wenn man berücksichtigt, dass die Linse durch die UV A- und B-Strahlung des Sonnenlichtes dauerhaft photooxidativem Stress ausgesetzt ist, fällt auf, dass diese Belastung eher selten zu einer kataraktogenen Destrukturierung führt (Borkman et al., 1996). Hinzu kommt, dass die Linse als abgekapseltes Gewebe weder vaskularisiert noch innerviert wird und somit keine Möglichkeit des zellulären oder metabolischen Umsatzes besitzt. Aus diesem Grund wird verständlich, dass die Linse sehr effiziente cytoprotektive Mechanismen besitzen muß und ihre Proteine sich durch eine hohe Stressresistenz auszeichnen (Graw 1997, für Übersicht). Sehr passend dazu konnte für α -Kristallin eine Chaperon-Funktion im Sinne eines Hitzschockproteins nachgewiesen werden, und möglicherweise werden β - und γ - Kristalline dadurch vor Aggregation geschützt (Horwitz, 1992, Borkman et al., 1996).

Obwohl Kristalline relativ lange als linsenspezifisch galten, so ist inzwischen die extralenticulare Expression für nahezu alle Untergruppen nachgewiesen worden, insbesondere in der neuralen Retina (Head et al., 1995; Jones et al., 1999, Magabo et al., 2000). Dies legt neben der strukturellen eine zusätzliche, nicht-refraktive Funktion für Kristalline nahe. Für eine Teilnahme an intrazellulären, metabolischen Signalkaskaden spricht der Befund, das ein Subtyp des β -Kristallins serin-spezifisch und in Abhängigkeit vom *second messenger* cAMP phosphoryliert werden kann (Kantorow et al., 1997). Welche genaue Rolle β - und γ -Kristalline intraneuronal spielen, ist momentan allerdings noch nicht bekannt.

Aufgrund des entwicklungsabhängigen zeitlichen Verlaufes der retinalen Kristallinexpression sehen manche Autoren einen Zusammenhang mit der Reifung von Nervengewebe (Head et al., 1995). Andere vermuten cytoprotektive Funktionen für Kristalline, da deren Expression in Mäuseretinae einige Tage postnatal am höchsten ist und einfallendes Licht beim erstmaligen Öffnen der Augen zur Apoptose von Photorezeptoren führen kann (Jones et al., 1999). Für eine cytoprotektive antiapoptotische Funktion sowohl intralenticular als auch intraneuronal spricht die Tatsache,

dass β - und γ - Kristalline sich durch einen hohen Gehalt an Thiolgruppen auszeichnen (Graw 1997, für Übersicht). Damit könnten sie an der intrazellulären Regeneration von Gluthathion mitwirken, welches eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung von freien Radikalen hat. Eine Verschiebung des intrazellulären Redoxstatus mit verstärktem Auftreten freier Radikale bei gleichzeitiger Erschöpfung antioxidativer Mechanismen kann zur neuronalen Apoptose führen (Floyd 1999, für Übersicht).

Übereinstimmend mit vorherigen Studien wurde die Expression von β - Kristallin auch in der vorliegenden Arbeit in der neuralen Retina und in RGZ nachgewiesen. Die Abnahme der Expression nach Axotomie kann zunächst damit erklärt werden, dass nach zwei Wochen über 90 % der RGZ absterben und somit ein Teil der Kristallin-positiven neuralen Retina verloren geht. Dass der β -Kristallin-Spot in den 2D-Gelen der axotomierten Retinae fast gänzlich verschwunden war, könnte bedeuten, dass in der übrigen neuralen Retina ebenfalls eine Expressionsabnahme stattfindet, dies in der Immunhistochemie aber nicht so deutlich zu sehen war. Ebenso könnte dies am verwendeten Antikörper liegen, der gegen β_H -Kristallin gerichtet war und somit nur einen Teil des β -Kristallins dargestellt hat, der möglicherweise nicht so starken Schwankungen unterlag. Nach Ersatz des Sehnerven durch ein Ischiassegment fanden sich wieder β -Kristallin-positive Zellen in der Ganglienzellschicht, die sich in der Intensität aber nicht wesentlich von den Zellen der Kontrollgruppe unterschieden.

Es steht somit fest, dass RGZ mit Kristallinen zwar einen eigenen Pool von Proteinen besitzen, denen auch extralental cytoprotektive Funktionen nachgesagt werden. Offensichtlich ist aber die Axotomie eine so große Stressbelastung für eine Ganglienzelle, dass die in den RGZ vorhandenen Kristallinmengen zur Verhinderung der Apoptose nicht ausreichen. Dies wird durch den Befund untermauert, dass intravitreal verabreichte β - und γ -Kristalline auf axotomierte RGZ eine sehr starke neuroprotektive und neuritogene Wirkung ausüben (Fischer, 2000). Sollte es durch exogenes Kristallin tatsächlich zu einer Auffüllung intraneuronaler Kristallinbestände kommen, müsste dieses allerdings in die Zellen aufgenommen werden oder über Rezeptoren die Regulation beeinflussen, was noch zu zeigen ist. Ebenso sollte die Überexpression von Kristallinen in Neuronen mit einer verstärkten Apoptoseresistenz verbunden sein.

4.2. Biochemisch meßbare Veränderungen in retinalen Gliazellen

4.2.1. Reaktion von Astroglia

Die konstitutive Expression von GFAP in der Retina ist auf Astrocyten in der optischen Faserschicht beschränkt (Bignami und Dahl, 1979) und wurde auch in dieser Arbeit bestätigt.

Müllerzellen jedoch exprimieren GFAP in nenneswertem Umfang nur als Folge von Verletzungen oder pathologischen Veränderungen im oculo-retinalen Bereich. So resultieren z.B. eine Sehnervtraumatisierung (Chen et al., 2002; Engelmann et al., 2001), eine ischämische retinale Schädigung (Nishyama et al., 2000), der Anstieg des intraokulären Druckes (Tanihara et al., 1997; WoldeMussie et al., 2001), eine intraokuläre Photokoagulation durch Laser (Humphrey et al., 1993), hochenergetische Bestrahlung der Retina (Grosche et al., 1995), oder auch Netzhautablösung (Erickson et al., 1992) stets in einer GFAP-Hochregulation in retinalen Müllerzellen. Diese genannten Beispiele sind ebenfalls im Einklang mit dem hier vorliegenden Befund, der eine (wenn auch moderate) Müllerzellaktivierung bereits durch die Sehnervaxotomie erkennen läßt.

Die Tatsache, dass die retinale GFAP-Expression nach Regeneration von RGZ höher ist als nach deren Verletzung alleine, stellt jedoch einen neuartigen Befund dar. Dieser deutet auf einen speziellen glio-neuronalen Signalweg hin, obwohl die Interaktion zwischen RGZ und Müllerzellen noch einer genaueren experimentellen Abklärung bedarf.

Die Unterschiede des Expressionsmusters der in diesem Experiment betrachteten glialen Proteine könnte auf unterschiedlichen Wegen nicht-neuronaler Zellaktivierung zwischen axotomierten und regenerierten Retinae beruhen. Der hier entscheidende Unterschied ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Anwesenheit des peripheren Nervengewebes, welches über axonale Regeneration oder Absterben von RGZ entscheidet. Obwohl es experimentell schwierig zu zeigen ist, so könnten einerseits gliotrope Faktoren aus dem Transplantat über Diffusion in die Retina gelangen (Berry et al., 1996, 1999) und so zur verstärkten Müllerzellreaktion beitragen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein retrograder Transport von Faktoren über die regenerierten RGZ-Axone stattfindet (Singer et al., 1982), was dann auf indirektem Wege zur Aktivierung astroglialer Zellen in der Retina führen würde.

Ungeachtet der Mechanismen, die die Müllerzell-Reaktion in regenerierten Retinae verursacht, ist es plausibel, dass solche aktivierte Astroglia die regenerativen Vorgänge unterstützt. So z.B. durch Sezernierung von neurotrophen Faktoren oder regenerationsfördernden Molekülen der Extrazellulärmatrix wie Laminin (Graeber und Kreutzberg, 1988).

Für eine regenerationsfördernde Rolle von Astrogliazellen sprechen zudem noch weitere experimentelle Befunde. So ist beispielsweise die Expression von Neurotrophin-mRNA in Astrocyten im Bereich axonaler Sprossung des verletzten Hippocampus erhöht (Guthrie et al., 1997). Außerdem wurde auch die Interaktion von Astrocyten und Axonen an der Kontaktstelle einer Opticus-Ischias-Anastomose cytologisch untersucht (Berry et al., 1988; Dezawa et al., 1999). In solchen Experimenten wurde gefunden, dass Astrocyten aus dem Sehnervstumpf regenerierende Axone umschlossen und auf diese Weise durch die Übergangszone ins periphere Nervengewebe führten (Dezawa et al., 1999).

Letzteres Experiment deutet ebenso wie der Befund dieser Dissertation darauf hin, dass eine regenerationsfördernde Rolle von Astroglia durch peripheres Nervengewebe induziert werden könnte.

Die Expression des Protoonkogens Bcl-2 in Müllerzellen wurde ebenfalls in früheren Studien beschrieben und man geht davon aus, dass Bcl-2 hier an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase der inneren Retina beteiligt ist (Chen et al., 1994). Aufgrund der bekannten Präsenz in Müllerzellen ist es daher nicht überraschend, dass die verstärkte GFAP-Expression nach Regeneration von Bcl-2 begleitet wird und somit die Müllerzellreaktion noch zusätzlich betont (Ragupathi et al., 2000, für Übersicht).

4.2.2. Reaktion von Mikroglia

Retinale Mikrogliazellen reagieren extrem sensitiv auf direkte Sehnervtraumata und retinale Ischämie. Deren Aktivierung und Phagozytoseaktivität ist aber auch bei hereditärer Neurodegeneration, wie in einem Tiermodell von veranlagter Photorezeptorendystrophie, nachgewiesen worden (Moore und Thanos, 1996, für Übersicht). Die topologische Verteilung der Mikroglia innerhalb der Retina spiegelt sich in der Geschwindigkeit und dem Muster des Ganglienzelltodes wieder. So werden zentralständige Ganglienzellen nach Sehnervaxotomie zuerst phagozytiert und der Degenerationsprozeß breitet sich dann zentrifugal bis zur Peripherie der Retina hin aus (Thanos et al., 1992). Die Motilität der Mikrogliazellen zwischen den retinalen Schichten verstärkt zusätzlich ihre Funktion in der Beseitigung von Zelldebris (Schnitzer und Scherer, 1990). Zusätzlich zum direkten Sehnervtrauma wurde eine Beteiligung von Mikroglia an neurodegenerativen Veränderungen neuerdings auch in einem Tiermodell von induzierbarem Glaukom nachgewiesen (Naskar et al., 2002).

Das in dieser Arbeit beobachtete gleich starke Erscheinen von Ox-42-positiven Mikrogliazellen in Retinae nach Ganglienzellregeneration und solchen nach Axotomie alleine war erwartet. Auch in Retinae, bei denen der Sehnerv durch ein Ischiassegment ersetzt wird, sterben mehr als 80 % der RGZ und werden von aktivierter Mikroglia phagozytiert.

In bisherigen Studien konnte neuronales Überleben und axonales Wachstum auch nur durch pharmakologische Inhibition von Mikrogliazellen gesteigert werden, während deren Stimulation die neurodegenerativen Effekte sogar noch verschlimmerte (Thanos et al., 1993). Insbesondere der letztgenannte Befund spricht dafür, dass aktivierte Mikrogliazellen im Gegensatz zu Astroglia generell negativ mit neuronaler Regeneration im ZNS interferieren.

4.3. Ausbleibender Zelltod nach Re-Axotomie – eine „Peripherisierung“ zentraler Neurone?

Retinale Ganglienzellen zeigen typische Eigenschaften von ZNS-Neuronen, wie durch den retrograden Zelltod als Reaktion auf Verletzung ihrer Axone deutlich wird. Ausgehend vom durchtrennten Sehnerven, aber auch von einem peripheren Nerven-Transplantat oder von zentralen visuellen Arealen, lassen sich RGZ mit Fluoreszenzfarbstoffen retrograd markieren. Dies erlaubt zum einen die einwandfreie Identifizierung ihrer Somata als auch die phänomenologische Verfolgung glio-neuronaler Interaktionen, die nach Axotomie der RGZ auftreten. Infolge dessen kann der Zellverlust nach Traumatisierung und die damit einhergehende phagozytoseabhängige Markierung von Mikrogliazellen dokumentiert und quantifiziert werden (Thanos, 1994). Grundsätzlich kann zum Zwecke des neuroanatomischen *Tracings* auf eine Reihe von Farbstoffen aus der Gruppe der Carbocyanine, Stilbene oder von Fluoreszeinderivaten zurückgegriffen werden. Für die einwandfreie morphologische Unterscheidung von RGZ und Mikrogliazellen im selben Präparat hat sich das Pyridiniumderivat Di-Asp als sehr geeignet herausgestellt. Aufgrund seiner Lipophilie hat Di-Asp gegenüber wasserlöslichen Markern wie z.B. Fluorogold insofern noch weitere Vorteile, als das die intraneuronale Retentionszeit praktisch dauerhaft ist. Dies bedeutet, dass die Di-Asp-Moleküle nicht vorzeitig in den Extrazellulärraum abgegeben und auf diese Weise von Mikroglia inkorporiert werden, sondern erst nach Phagozytose von RGZ (Thanos, 1994). Dies ist essentiell für die sichere morphologische Unterscheidung der beiden Zelltypen insbesondere über einen längeren Zeitraum, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

Das Ausbleiben eines signifikanten Zellverlustes nach Re-Axotomie regenerierter RGZ innerhalb der peripheren nervösen Umgebung deutet auf den Gewinn typischer peripher-neuronaler Eigenschaften hin (Kreutzberg, 1982, für Übersicht). Diese Eigenschaften manifestieren sich dadurch, dass re-axotomierte RGZ dem retrograden Zelltod und damit einhergehend der mikroglialen Phagozytose für wenigstens 4 Wochen widerstehen können. Neben der schon bekannten PNS-typischen glialen Myelinisierung der regenerierten Axone (Vidal-Sanz et al., 1987) ist die stark verringerte perikaryale Vulnerabilität eine neuartige Charakteristik für regenerierte RGZ. Die verstärkte posttraumatische Überlebenstendenz der Neurone, die im Kontakt zu Schwann'schen Zellen stehen, ist damit vereinbar und erklärbar, das von diesen Gliazellen eine umfassende neurotrophe Versorgung ausgeht (Bunge, 1994; Maffei et al., 1996).

Die erhöhte Überlebenstendenz der regenerierten RGZ wird auch dadurch deutlich, dass über den Zeitraum der Re-Axotomie nur extrem wenig transzellulär gefärbte Mikrogliazellen gefunden wurden. Dies ist aber sehr wohl mit dem Befund vereinbar, dass in regenerierten Retinae Ox-42-positive, aktivierte Mikroglia auftreten (Vergl. 3.3.1.). Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass auch in regenerierten Retinae durch den Transplantationsvorgang große Teile der RGZ absterben und somit phagozytiert werden.

Das Resultat der Re-Axotomie-Studie läßt die wichtige Schlußfolgerung zu, dass Mikrogliazellen verletzte regenerierte RGZ nicht mehr als verletzt erkennen. Das Signal, welches nach Axotomie der RGZ normalerweise zur Mikrogliaaktivierung führt (sei es durch die Präsentation von Antigenen oder Sekretion von Signalmolekülen) wird beim axonalen Kontakt zu Schwann'schen Zellen unterdrückt. Das retrograde, axotomieabhängige und zum neuronalen Zelltod führende Signal oder dessen Ausbleiben ist immer noch weitestgehend unbekannt. Deswegen kann die unterschiedliche Reaktion von normalen RGZ und regenerierten RGZ auf die Axotomie als experimentelle Basis genutzt werden, um dieses Signal näher zu bestimmen. Dies kann durch Analyse bestimmter Proteine geschehen, die nach Axotomie in normalen und regenerierten RGZ bzw. in zentralen und peripheren Neuronen unterschiedlich exprimiert werden.

Ein solcher Signalweg könnte beispielweise die sog. JAK-STAT-Kaskade sein (*Janus kinases* und *signal transducers and activators of transcription*). Dieser Signalweg wird durch bestimmte Cytokine wie z.B. einige Interleukine oder Neurotrophine aktiviert und ist als zelluläre Reaktion auf Verletzung in peripheren Neuronen bekannt (Hughes et al., 1993). In dieser Signalkaskade kommt es über eine Aktivierung von JAKs zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT-Molekülen, die daraufhin in den Zellkern transloziert werden und folglich die Transkription überlebensrelevanter Gene initiieren (Darnell, 1997, für Übersicht). Für den besagten Signalweg konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung seiner Komponenten nach Axotomie von Neuronen mit zentraler Projektion nicht auftritt (Schwaiger et al., 2000). In ähnlicher Weise führt auch nur die periphere, nicht aber die zentrale Axotomie von Neuronen zur Expressionsänderungen bestimmter Neuropeptide (Reimer und Kanje, 1999). Wenn regenerierte RGZ in metabolischer Hinsicht peripher-neuronale Eigenschaften annehmen, sollte deren Axotomie im Vergleich zu normalen RGZ ähnliche Unterschiede in der Signaltransduktion hervorrufen (Vergl. Abb. 31).

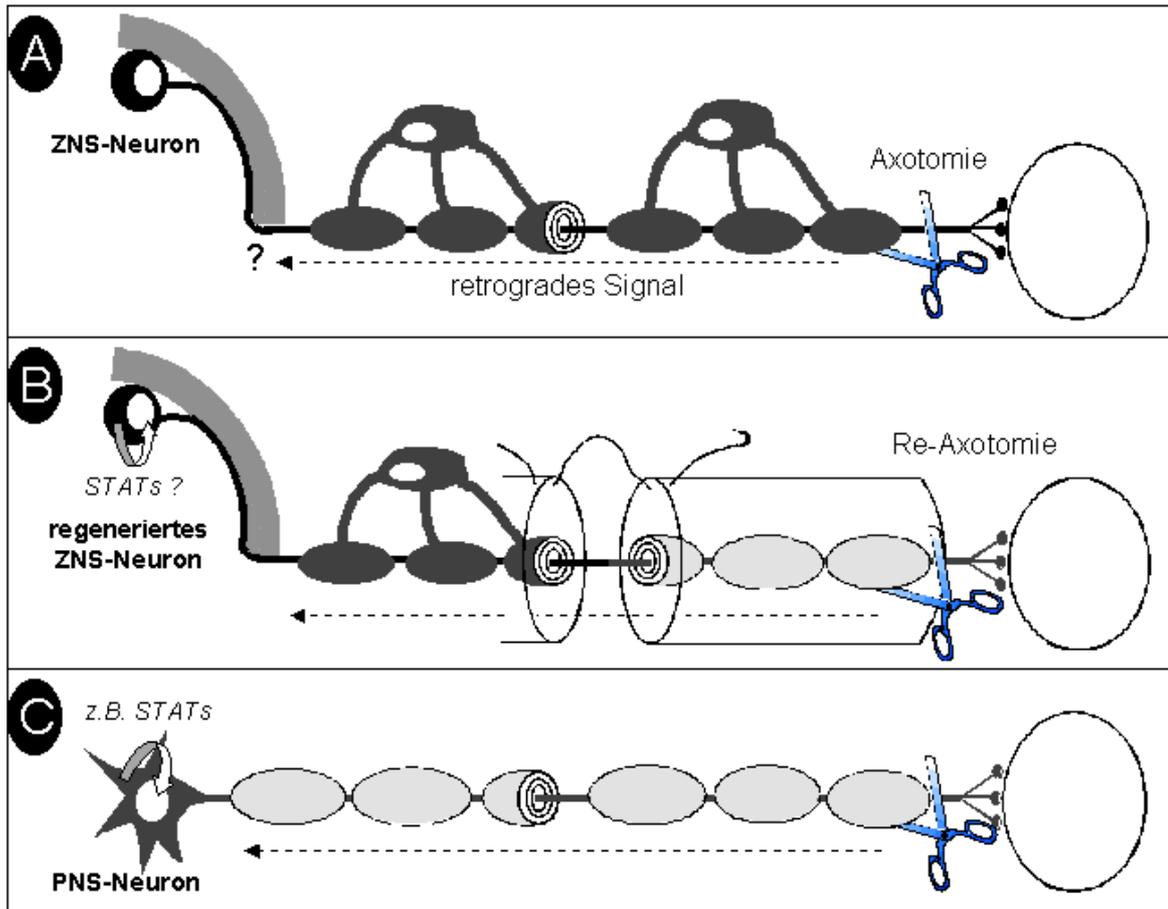


Abb. 31 Schematische Darstellung experimenteller Optionen

Das Resultat der Re-Axotomie-Studie kann zum tieferen Verständnis der Prozesse beitragen, die ein axotomiertes ZNS-Neuron (A) zum retrograden Zelltod zwingen. Bei der Re-Axotomie eines regenerierten und somit „peripherisierten“ Neurons (B) sollten ähnliche Signalsubstanzen auftreten, die bereits bei der Axotomie eines peripheren Neurons (C) in Erscheinung getreten sind und vermutlich dessen Überleben sichern. Wahrscheinlich führt das Ausbleiben solcher Signalmoleküle bei ZNS-Neuronen zum retrograden Zelltod und zur Phagozytose durch Mikrogliazellen.

4.4. Interaktion von regenerierenden RGZ-Axonon und Skelettmuskulatur

Die vorliegende Resultat zeigt, dass regenerierende RGZ-Axone in der Lage sind, nach Austritt aus dem Ischiassegment quergestreifte Muskulatur über mehrere 100 μm zu penetrieren. Die Wachstumsrichtung der Axone erfolgt hierbei immer parallel zu Myofibrillenbündeln, nie aber quer dazu, was auf eine spezifische myo-axonale Interaktion hindeutet. Die (zu diesem Zeitpunkt) beobachtete leichte terminale Verzweigung von einigen RGZ-Axonon entspricht zwar bei weitem nicht der von Motoaxonon im Bereich muskulärer Endplatten (Rohen, 1994, für Übersicht). Auch müßte die Ausbildung von synaptischen Endigungen durch Elektronenmikroskopie, vor allem nach späteren Zeitpunkten, untermauert werden. Trotzdem scheinen aber einfache, neuroanatomische Voraussetzungen für die Innervation eines peripheren Zielgewebes durch ein sensorisches ZNS-Neuron gegeben zu sein.

Wie bei früheren Rekonnektionsexperimenten muß auch hier beachtet werden, dass die Umleitung von regenerierenden Axonen in ein peripher-neuronales Zielgebiet in mancherlei Hinsicht von der Embryogenese abweicht. Dies hat zur Folge, dass die Restauration von Projektionen topographisch desorientiert und funktionell unbrauchbar sein kann, wenn wegfindungsrelevante Stimuli aus der Embryogenese nicht zugegen sind (Thanos und Mey, 2000, für Übersicht). Ein entscheidender Unterschied zwischen der Embryogenese der motorischen Projektion und der hier durchgeführten Reinnervation hierzu liegt bereits im Ursprungsgebiet der Neurone. Motoaxone entspringen dem sich entwickelnden Rückenmark und man geht davon aus, dass sie die wegfindungsrelevante Prägung bereits in unmittelbarer Umgebung des Rückenmarks erhalten (Burden, 1998, für Übersicht). Eine solche muskulotrope Prägung ist für regenerierende RGZ-Axone unwahrscheinlich, da man nicht davon ausgehen kann, dass die dafür erforderlichen zellulären oder extrazellulären Strukturen im ausgereiften Ischiasnerven vorkommen. Ein weiterer Unterschied zwischen Embryogenese und Reinnervation liegt darin, dass die Ausbildung von ursprünglichen neuromuskulären Synapsen in einem Stadium erfolgt, wo das Muskelgewebe selbst noch nicht ausgereift ist (Burden, 1998, für Übersicht).

Da aber eine Reinnervation von Muskelfasern generell möglich ist, scheint bei der Resynaptogenese Schwann'schen Zellen eine wichtige Rolle zuzukommen (Son et al., 1996, für Übersicht). Vom ersten myo-axonalen Kontakt bishin zur Ausbildung ausgereifter neuromuskulärer Synapsen mit charakteristischen terminalen Verzweigungen vergehen in Säugetieren mehrere Wochen. Wenn man davon ausgeht, dass die RGZ-Axone zum Durchwachsen des Ischiassegmentes bereits ca. 6 Wochen

brauchten, stand mit weiteren 2 Wochen zur Ausbildung typischer neuromuskulärer Terminalen relativ wenig Zeit zur Verfügung. Folglich hatten viele darstellbare, auf Muskelfasern regenerierende Axonterminalen auch eher eine wachstumstypische Morphologie.

Die Abwesenheit von Cholinacetyltransferase (ChAT) in regenerierten RGZ liegt wahrscheinlich daran, dass RGZ grundsätzlich nicht cholinerg sind und eine solche Umprogrammierung durch regenerative Vorgänge nicht initiiert werden kann. Nichts desto trotz ist die Formation von neuromuskulären Synapsen auch durch nicht-cholinerge Neurone möglich. So hatte in einem ChAT-*knock-out*-Modell das Fehlen des Neurotransmitters Acetylcholin zwar Auswirkungen auf die Verteilung von muskulären Synapsen im Zielgebiet, aber nicht auf die Fähigkeit, solche grundsätzlich auszubilden (Misgeld et al., 2002). Es muß allerdings hinzugefügt werden, dass die Mäuseembryonen, die diesen Gendefekt homozygot tragen, sich bis zur Geburt entwickeln und perinatal absterben. So muß davon ausgegangen werden, dass die bis dahin gebildeten neuromuskulären Synapsen ohne Acetylcholin funktionell untauglich sind. Vor diesem Hintergrund scheint die Innervation einer Muskelfaser durch ein sensorisches ZNS-Neuron nur aus morphologischer, nicht jedoch aus funktioneller Sicht möglich.

4.5. Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit gehen prinzipiell zwei neue Aspekte hervor. Zum einen ist eine stärkere Aktivierung von retinalen Müllerzellen bei der Regeneration von RGZ als nach deren Axotomie alleine zu nennen. Astrogliazellen, deren Rolle in der neuronalen Regenerationsforschung sehr kontrovers diskutiert wird, scheinen im Transplantationsparadigma eher positiv mit dem axonalen Wachstum von RGZ zu interagieren. Worauf dies zurückzuführen ist, könnte beispielsweise durch die astrogliale Synthese von trophischen Molekülen oder Extrazellulärmatrixkomponenten, in Abhängigkeit von der Aktivierung, untersucht werden.

Zum anderen ist die unterschiedliche Reaktion von normalen und regenerierten RGZ auf die Axotomie ein neuartiger Befund. Der ausbleibende retrograde Zelltod nach Re-Axotomie von regenerierten RGZ suggeriert den Gewinn peripher-neuronaler Eigenschaften. Bestimmte Signalsubstanzen wie z.B. Transkriptionsfaktoren der STAT-Gruppe, deren Modulation in axotomierten PNS-Neuronen mit deren Überleben korreliert, könnten auch in re-axotomierten RGZ in Erscheinung treten.

Dieser Befund kann als experimentelle Grundlage dafür dienen, die Prozesse näher zu bestimmen, die axotomierte ZNS-Neurone zum retrograden Zelltod zwingen, axotomierte PNS-Neurone oder „peripherisierte“ RGZ jedoch nicht.

5. Zusammenfassung

Das Regenerationsdefizit von ZNS-Neuronen nach axonaler Verletzung liegt einerseits in der Anwesenheit myelinassoziierter inhibitorischer Proteine und andererseits in der ausbleibenden Stimulation mit trophischen Peptiden durch das Zielgewebe begründet. Die axonale Regeneration von verletzten ZNS-Neuronen, z.B. axotomierten RGZ, ist jedoch innerhalb von peripheren Nerven-Transplantaten aufgrund der neurotrophen Versorgung durch Schwann'sche Zellen möglich. Das Transplantationsparadigma, bei dem der durchtrennte Sehnerv durch ein Ischiasnervsegment ersetzt wird, ist in der Regenerationsforschung ein seit Jahren fest etabliertes Modell. Es erlaubte die Durchführung sowohl von neuropharmakologischen Studien als auch Reinnervationsversuchen von Zielgeweben.

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden ob A) der peripher-nervöse Sehnerversatz biochemisch meßbare, regenerationspezifische Änderungen in der Retina auslöst und B) inwieweit regenerierende RGZ dadurch selbst peripher-nervöse Eigenschaften annehmen.

Unbehandelte Retinae, Retinae 2 Wochen nach Sehnervaxotomie sowie solche 2 Wochen nach Axotomie und RGZ-Regeneration in ein Ischiasnervtransplantat wurden biochemisch miteinander verglichen. Der Suche nach differentiell exprimierten Proteinen innerhalb der drei Gruppen geschah einerseits durch Proteinmustervergleich (1/2 D-Elektrophorese) als auch mithilfe spezifischer Antikörper (Immunhistochemie/*Western blot*). Um die Gewinnung peripher-neuronaler Eigenschaften durch regenerierte RGZ festzustellen, wurde zunächst eine Vulnerabilitätsanalyse durchgeführt. Dafür wurde die 4-Wochen-Überlebensrate von regenerierten RGZ nach deren Re-Axotomie im Transplantat mithilfe neuroanatomischer Färbetechniken im Vergleich zu normalen RGZ bestimmt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob und wie regenerierende RGZ-Axone in periphere Zielgewebe, hier quergestreifte Muskulatur, einwachsen können. Zuletzt sollte getestet werden, ob regenerierte RGZ das periphere Neurotransmitterenzym Cholinacetyltransferase exprimieren.

Die astroglialen Proteine GFAP und Bcl-2 werden in regenerierten Retinae deutlich stärker exprimiert als in Retinae nach Sehnervaxotomie alleine oder ohne Behandlung. Die Expressionsteigerung war besonders in retinalen Müllerzellen feststellbar. Eine Aktivierung dieser Zellen ist normalerweise eine Reaktion auf Sehnervtrauma oder intraokuläre Entzündung. Der beobachtete Befund legt nahe, dass inflammationsähnliche Prozesse oder eine sekretorische Aktivität von Astroglia auch bei der Regeneration von

Neuronen eine Rolle spielen können. Die Expression von normalerweise lentalem β -Kristallin in der neuralen Retina ist nach Degeneration axotomierter RGZ herabgesetzt, nimmt aber mit deren axonaler Regeneration in ein peripheres Nervensegment wieder zu. Über die extralentale Funktion von Kristallinen herrscht noch weitestgehend Unklarheit, doch werden auch hier cytoprotektive Aufgaben diskutiert. Das stressinduzierbare Hitzeschockprotein Hsp27 wird durch Sehnervaxotomie in (noch lebenden) RGZ hochreguliert, während dessen Expression durch axonale Regeneration der RGZ wieder abnimmt. Die antiapoptotische Funktion von Hsp27 ist bereits bekannt. Dessen Überexpression in verletzten RGZ scheint diesen ein Langzeitüberleben zu ermöglichen. Der Hsp27-abhängige Überlebensweg wird von axotomierten RGZ offenbar nicht mehr genutzt, wenn wieder eine retrograde Neurotrophinversorgung durch Schwann'sche Zellen des Transplantates stattfindet.

Re-Axotomie von regenerierten RGZ innerhalb des Transplantates führt nicht zu signifikantem retrogradem Zelltod für wenigstens 28 Tage. Damit einhergehend ist auch die mikrogliale Phagozytose extrem reduziert. Bei Kontakt von regenerierten RGZ-Axonon mit quergestreifter Muskulatur als peripherem Zielgewebe findet eine axonale Invasion über mehrere 100 μm statt, die von der Ausrichtung der muskulären Mikrostruktur abhängt. RGZ, deren Axone in peripheres Nervengewebe regenerieren, zeigen keine immunchemisch meßbare Expression des peripher-neuronalen Transmitterenzym Cholinacetyltransferase. Auch wenn regenerierte RGZ nicht ChAT-positiv sind, so ist die axonale Invasion in quergestreiftes Muskelgewebe und v.a. der ausbleibende Zelltod nach Re-Axotomie peripheren Neuronen, z.B. Motoneuronen nicht unähnlich.

Das Signal bzw. das ausbleibende Signal, welches axotomierte ZNS-Neurone zum retrograden Zelltod zwingt, ist noch nicht hinreichend bekannt. Deswegen kann die unterschiedliche Reaktion von normalen RGZ und regenerierten RGZ auf eine Axotomie zum tieferen Verständnis dieses Signals beitragen. Falls regenerierte RGZ peripher-neuronale Eigenschaften in metabolischer Hinsicht annehmen, sollten in re-axotomierten RGZ ähnliche Signalsubstanzen auftreten, die bereits in axotomierten PNS-Neuronen identifiziert wurden und vermutlich überlebensrelevant sind.

6. Literaturverzeichnis

Ard, M.D., Bunge, M.B., Wood, P.M., Schachner, M. and Bunge, R.P. Retinal neurite outgrowth on astrocytes is not modified by extracellular matrix, anti-L1 antibody, or oligodendrocytes. *Glia* **4** (1991) 70-82

Berkelaar, M., Clarke, D.B., Wang, Y.C., Bray, G.M. and Aguayo, A.J. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* **14** (1994) 4368–4374.

Barinoga, M. Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies. *Science* **287** (2000) 1421-1422

Berry, M., Hall, S., Follows, R., Rees, L., Gregson, N. and Sievers, J. Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J. Neurocytol.* **17** (1988) 727–744.

Berry, M., Carlile, J. and Hunter, A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J. Neurocytol.* **25** (1996) 147–170.

Berry, M., Carlile, J., Hunter, A., Tsang, W., Rosustrel, P. and Sievers, J. Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic nerve chiasm into the optic tracts. *J. Neurocytol.* **28** (1999) 721–741.

Bignami, A. and Dahl, D. The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye Res.* **28** (1979) 63-69.

Borkman R.F., Knight, G. and Obi, B. The molecular chaperone alpha-crystallin inhibits UV-induced protein aggregation. *Exp. Eye Res.* **62** (1996) 141-148

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254

Bunge R.P. The role of Schwann cell in trophic support and regeneration. *J. Neurol.* **242** (Suppl. 1) (1994) 19-21

Burden, S. J. The formation of neuromuscular synapses. *Gen. Dev.* **12** (1998) 133-148

Cajal, R.Y. Degeneration and regeneration in the nervous system (May, R.M., ed.). (1928) University Press, London

Canning, D.R., Hoke, A., Malemund, C.J. and Silver, J. A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates the extracellular matrix of reactive astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* **14** (1996) 153-173

Caroni, P. and Schwab, M.E. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes non-permissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* **1** (1988) 85–96.

Carter, D.A., Aguayo, A.J. and Bray, G.M. Retinal ganglion cell terminals in the hamster superior colliculus: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* **311** (1991) 97-102

Chen, H. and Weber, A.J. Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia* **38** (2002) 115-125

Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F. and Schwab, M.E. Nogo-A is a myelin-associated neurite growth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403** (2000) 434-439

Chen, S.T., Garey, L.J. and Jen, L.S. Bcl-2 proto-oncogene immunoreactivity in normally developing and axotomized rat retinas. *Neurosci. Lett.* **172** (1994) 11-14

Chierzi, S., Cenni, M.C., Maffei, L., Pizzurusso, C., Porciatti, V., Ratto, G.M. and Strettoi, E. Protection of retinal ganglion cells and preservation of function after optic nerve lesion in *bcl-2*-transgenic mice. *Vision Res.* **38** (1998) 1537-1543

Chu, B., Soncin, F., Price, B.D., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor 1. *J. Biol. Chem.* **48** (1996) 30847-30857

Cohen, J. J., Duke, R.C., Vadok, V.A. and Sellins, K. S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10** (1992) 267-293

Culmsee, C., Stumm, R.K., Schaefer, M.K., Weihe, E. and Krieglstein, J. Clenbuterol induces growth factor mRNA , activates astrocytes and protects rat brain tissue against ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* **838** (1999)184-192

Darnell, J.E.J. STATs and gene regulation. *Science* **365** (1997) 253-255

Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **13** (1999) 2905-2927

David, S. and Aguayo, A.J. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214** (1981) 931–933.

Davies, S.J., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G. and Silver, J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* **390** (1997) 680-683

Dezawa, M., Kawana, K., Negishi, H. and Adachi-Usami, E. Glial cells in the degenerating and regenerating optic nerve of adult rat. *Brain. Res. Bull.* **48** (1999) 573–579.

Doherty, N.S., Littmann, B.H., Reilly, K., Swindell, A.C., Buss, J.M. and Anderson, N.L. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19** (1998) 355-363

Engelmann, R., Dietrich, D.C., Bien, A. and Kreutz, M.R. A different glia response to optic nerve injury/lipopolysaccharide administration in hooded and albino rats. *Brain Res.* **889** (2001) 251-255

Erickson, P.A., Feinstein, S.C., Lewis, G.P. and Fisher, S.K. Glial fibrillary acidic protein and its mRNA: ultrastructural detection and determination of changes after CNS injury. *J. Struct. Biol.* **108** (1992) 148-161

Fischer, D., Heiduschka, P. and Thanos, S. Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Exp. Neurol.* **172** (2001) 257-272

Fischer, D. Protektiver Einfluss von β - und γ -Kristallinen auf das neuronale Überleben und die axonale Regeneration im adulten Zentralen Nervensystem (Dissertation). *Tectum Verlag Marburg* (2000)

Fischer, D., Pavlidis, M. and Thanos, S. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cells death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41** (2000) 3943-3954

Floyd, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222** (1999) 236-245

Friedmann, B. and Aguayo A.J. Injured neurons in the olfactory bulb of the adult rat grow axons along grafts of peripheral nerve. *J. Neurosci.* **5** (1985) 1616-1625

Goldberg, J.L., Espinosa, J.S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G.T. and Barres, B.A. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* **33** (2002) 689-702

Goldberg, J.L. and Barres, B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **23** (2000) 579-612

Goldberg, J.L. and Barres, B.A. Neuronal regeneration: Extending axons from bench to brain. *Curr. Biol.* **8** (1998) 310-312

Graeber, M.B. and Kreutzberg, G.W. Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J. Neurocytol.* **17** (1988) 209-220.

Grand Pre, T., Nakamura, F., Vartanian, T. and Strittmacher, S.M. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* **403** (2000) 439-444

- Graw, J. The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol. Chem.* **378** (1997) 1331-1348
- Grosche J., Hartwig, W. and Reichenbach A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase and Bcl-2 protooncogene by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci. Lett.* **185** (1995) 119-122
- Guthrie, K.M., Woods, A.G., Nguyen, T. and Gall, C.M. Astroglial ciliary neurotrophic factor is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **386** (1997) 137-148
- Head, M.W., Sedowofia, K. and Clayton, R.M. β 2-crystallin in the mammalian retina. *Exp. Eye Res.* **61** (1995) 423-428
- Heiduschka, P. and Thanos, S. Restoration of the visual pathway. *Progr. Ret. Eye Res.* **19** (2000) 577-606
- Horwitz, J. α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 10449-10453
- Hughes, R.A., Sendtner, M. and Thoenen, H. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vivo and in vitro. *J. Neurosci. Res.* **36** (1993) 663-671
- Humphrey, M.F., Constable, I.J., Chu, Y. and Wiffen, S. A quantitative study of the lateral spread of Muller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **334** (1993) 545-558
- Inoue, T., Hosokawa, M., Morigiwa, K., Ohashi, Y. and Fukuda, Y. Bcl-2-overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J. Neurosci.* **22** (2002) 4468-4477
- Jones, S.E., Jomary, C., Grist, J., Makwana, J. and Neal, M.J. Retinal expression of γ -crystallins in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40** (1999) 3017-3020

Kantorow, M., Horwitz, J., Sergeev, Y., Hejtmanik, J.F. and Piatigorsky, J. Extralenticular expression, cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of β B2-Crystallin [ARVO Abstract]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38** (1997) 205, Abstract nr. 998

Kreutzberg, G.W., Acute Neural Reaction to Injury. In Nicholls, J.G.(ed), *Repair and Regeneration of the Nervous System*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, pp. 57-69

Kermer, P., Klocker, N., Labes, M. and Bahr, M. Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary death in vivo. *J. Neurosci.* **18** (1999) 4656-4662

Krueger-Naug, A.M.R., Emsley, J.G., Myers, T.L., Currie, R.W. and Clarke, D.B. Administration of brain-derived neurotrophic factor suppresses the expression of heat shock protein 27 in rat retinal ganglion cells following axotomy. *Neurosci.* **116** (2003) 49-58

Krueger-Naug, A.M.R., Emsley, J.G., Myers, T.L., Currie, R.W. and Clarke, D.B. Injury to retinal ganglion cells induces expression of the small heat shock protein Hsp27 in the rat visual system. *Neurosci.* **110** (2002) 653-665

Laemmli, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of the bacteriophage T 4. *Nature* **227** (1970) 680-685

Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A.S. and Schwartz, M. Peripheral nerve-stimulated macrophages stimulate a peripheral nerve-like response in rat transected optic nerve. *Glia* **24** (1998) 329-337

Leon, S., Yugin, Y., Nguyen, N., Irwin, N. and Benowitz, L.I. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* **20** (2000) 4615-4625

Lewis, S.E., Mannio, R.J., White, F.A., Coggeshall, R.E., Beggs, S., Costigan, M., Martin, J.L., Dillman, W.H. and Woolf, C.J. A role for hsp27 in sensory neuron survival. *J. Neurosci.* **19** (1999) 8945-8953

- Ling, E.A., Kaur, L.C., Yick, T.Y. and Wong, W.C. Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with Ox-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. *Anat. Embryol.* **182** (1990) 481-486
- Maffei, L., Carmignoto, G., Perry, V.H., Candeo, P. and Ferrari, G. Schwann cells promote the survival of retinal ganglion cells after optic nerve transection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 1855-1859
- Magabo, K.S., Horwitz, J., Piatigorsky, J and Kantorow, M. Expression of β B2-Crystallins mRNA and protein in retina, brain and testis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41** (2000) 3056-3060
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y. C., Bray, G.M. and Aguayo, A.J. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 1632-1636
- Martinou, J.C., Dubois-Dauphin M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowsky, H. et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* **13** (1994) 1017-1030
- Masland, R.H. and Tauchi, M. The cholinergic amacrine cells. *Trends. Neurosci.* **9** (1986) 218-223
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J. and Braun, P.E. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13** (1994) 805–811.
- Merck, K.B., Groenen, P.J., Voorter, C.E., de Haard-Hoekmen, W.A., Horwitz, J., Bloemendal, H. and de Jong, W.W. Structural and functional similarities fo bovine alpha-crystalline and a mouse small heat shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 1046-1052
- Merry, D.E. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **20** (1997) 245-267

Mey, J. and Thanos, S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* **602** (1993) 30-17

Meyer-Franke, A., Wilkinson, G.A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E. et al. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* **21** (1998) 681-693

Misgeld, T., Burgness, R.W., Lewis, R.M., Cinnigham, J.M., Lichtman, J.W. and Sanes, J.R. Roles of neurotransmitter in synapse formation: Development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* **36** (2002) 635-648

Mishima, T., Fujiwara, T. and Akagawa, K. Reduction of neurotransmitter release by the exogenous H3 domain peptide of HPC-1/syntaxin 1A in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **329** (2002) 273-276

Moore, S. and Thanos, S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Progr. Neurobiol.* **48** (1996) 441-460

Morimoto, R.I., Sarge, K.D. and Abravaya, K. Transcriptional regulation of heat shock proteins. A Paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 21987-21990

Naskar, R., Wissing, M. and Thanos, S. Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43** (2002) 2962-2968

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhard, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focussing gels with clear background and and nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9** (1988) 255-262

Nishyama, T., Nishukawa, S., Hiroshi, Tomita and Tamai M. Muller cells in the preconditioned retinal ischemic injury rat. *Tohoku. J. Exp. Med.* **191** (2000) 221-232

Nunez, G., Benedict, M., Hu, Y. and Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17** (1999), 3237-3245

- Oppenheim, R.W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14** (1991) 453-502
- Purves, D. *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*. Cambridge, MA. *Harvard Univ. Press* (1988)
- Raghupathi, R., Graham, D.I. and McIntosh, T.K. Apoptosis after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* **17** (2000) 927–938.
- Reimer, M. and Kanje, M. Peripheral but not central axotomy promotes axonal outgrowth and induces alterations in neuropeptide synthesis in the nodose ganglion of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **10** (1999) 3415-3423
- Rohen, J.W. *Funktionelle Anatomie des Nervensystems*. *Schattauer Verlag*; Stuttgart/New York (1994) 75ff; 167ff
- Salzer, J.L. and Bunge, R.P. Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration and direct injury. *J. Cell Biol.* **84** (1980) 739-752
- Samardzic, M., Grujicic, D., Rasulic, L. and Bacetic, D. Transfer of the medial pectoral nerve: myth or reality? *Neurosurg.* **50** (2002) 1277-1282
- Savio, T. and Schwab, M.E. Rat CNS white matter but not gray matter is nonpermissive for neuroal cell adhesion and fiber outgrowth. *J. Neurosci.* **9** (1989) 1126-1133
- Schnell, L. and Schwab, M.E. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated growth inhibitors. *Nature* **343** (1990) 269-272
- Schnitzer, J. and Scherer, J. Microglial responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.* **302** (1990) 779-791
- Schwab, M.E. and Caroni, P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* **5** (1988) 2415-2423

Schwaiger, F.W., Hager, G., Schmitt, A.B., Horvat, A., Hager, Gu., Streif, R., Spitzer, C. et al. Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur. J. Neurosci.* **12** (2000) 1165-1176

Schwartz, M. and Moalem, G. Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination. *J. Neuroimmunol.* **113** (2001) 185-192

Shen, S, Wiemelt, A.P., McMorris, F.A. and Barres, B.A. Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* **23** (1999) 285-295

Singer, P.A., Mehler, S. and Fernandez, H.L.. Blockade of retrograde axonal transport delays the onset of metabolic and morphologic changes induced by axotomy. *J. Neurosci.* **2**. (1982) 1299–1306.

Son, Y.J., Trachtenberg, J.T. and Thompson, W.J. Schwann cells induce sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci.* **19** (1996) 280-285

Sperry, R.W. Optic nerve regeneration with return of vision in anurans. *J. Neurophysiol.* **7** (1944) 57-69

Tanihara, H., Hangai, M., Sawaguchi, S., Abe, H., Kageyama, M., Nakazawa, F., Shirasawa, E. and Honda, Y. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **115** (1997) 752-756

Terengi, G. Peripheral nerve injury and regeneration. *Histol. Histopathol.* **10** (1995) 709-718

Tezel, G. and Wax, M.B. Mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J. Neurosci.* **20** (2000) 3552-3562

Tezel, G., Seigel, G.M. and Wax, M.B. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39** (1998) 2277-2287

Thanos S. and Mey, J. Development of the visual system of the chick.II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain. Res. Rev.* **35** (2001) 205-245

Thanos, S., Naskar, R. and Heiduschka, P. Regenerating ganglion cell axons in the adult rat establish retinofugal topography and restore visual function. *Exp. Brain. Res.* **114** (1997) 255-267

Thanos, S. and Mey, J. Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cell axons in the retina of adult rats. *J. Neurosci.* **15** (1995) 1057- 1079

Thanos, S., Kacza, J., Seeger, J. and Mey, J. Old dyes for new scopes:the phagocytose dependent long-term labeling of microglial cells in vivo. *Trends Neurosci.* **17** (1994) 177-182

Thanos , S., Mey, J. and Wild, M. Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degeneration and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* **13** (1993) 455-466

Thanos, S. Adult retinofugal axons regenerating through peripheral nerve grafts can restore the light-induced pupilloconstriction reflex. *Eur. J. Neurosci.* **4** (1992) 691-699

Thanos, S., Pavlidis, C., Mey, J. and Thiel, H. Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp. Eye. Res.* **55** (1992) 101-117

Thanos, S. The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **3** (1991) 1189-1207

Vaney, D.J. The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina. *Progr. Retinal. Res.* **9** (1990) 1-46

Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegas-Perez, M.P., Thanos, S. and Aguayo, A.J. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in adult rat. *J. Neurosci.* **.7** (1987) 2894–2909

Wagstaff, M.J, Collaco-Moraes, Y., Smith, J., de Belleruche, S.J., Coffin, R.S. and Latchman D.S. Protection of neuronal cells from apoptosis by hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 5061-5069

Watanabe M., Sawai H. and Fukuda, Y. Myelination of regenerated optic nerve fibers in peripheral nerve graft of adult rats. *Exp. Brain Res.* **98** (1994) 39-43

Watanabe, M., Sawai, H. and Fukuda, Y. Axonal regeneration of retinal ganglion cells in the cat geniculocortical pathway. *Brain Res.* **560** (1991) 330-333

Welch, W.J. Mamalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Pysiol. Rev.* **72** (1992) 432-437

WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M. and Wheeler, L.A. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42** (2001) 2849-2855

Xu, W.D., Gu, Y.D., Xu, J.G. and Tan, L.J. Full-length phrenic nerve transfer by means of video-assisted thoracic surgery in treating brachial plexus avulsion injury. *Plast. Reconstr. Surg.* **110** (2002) 104-109

7. Anhang

7.1 MALDI-TOF-MS-Spektren

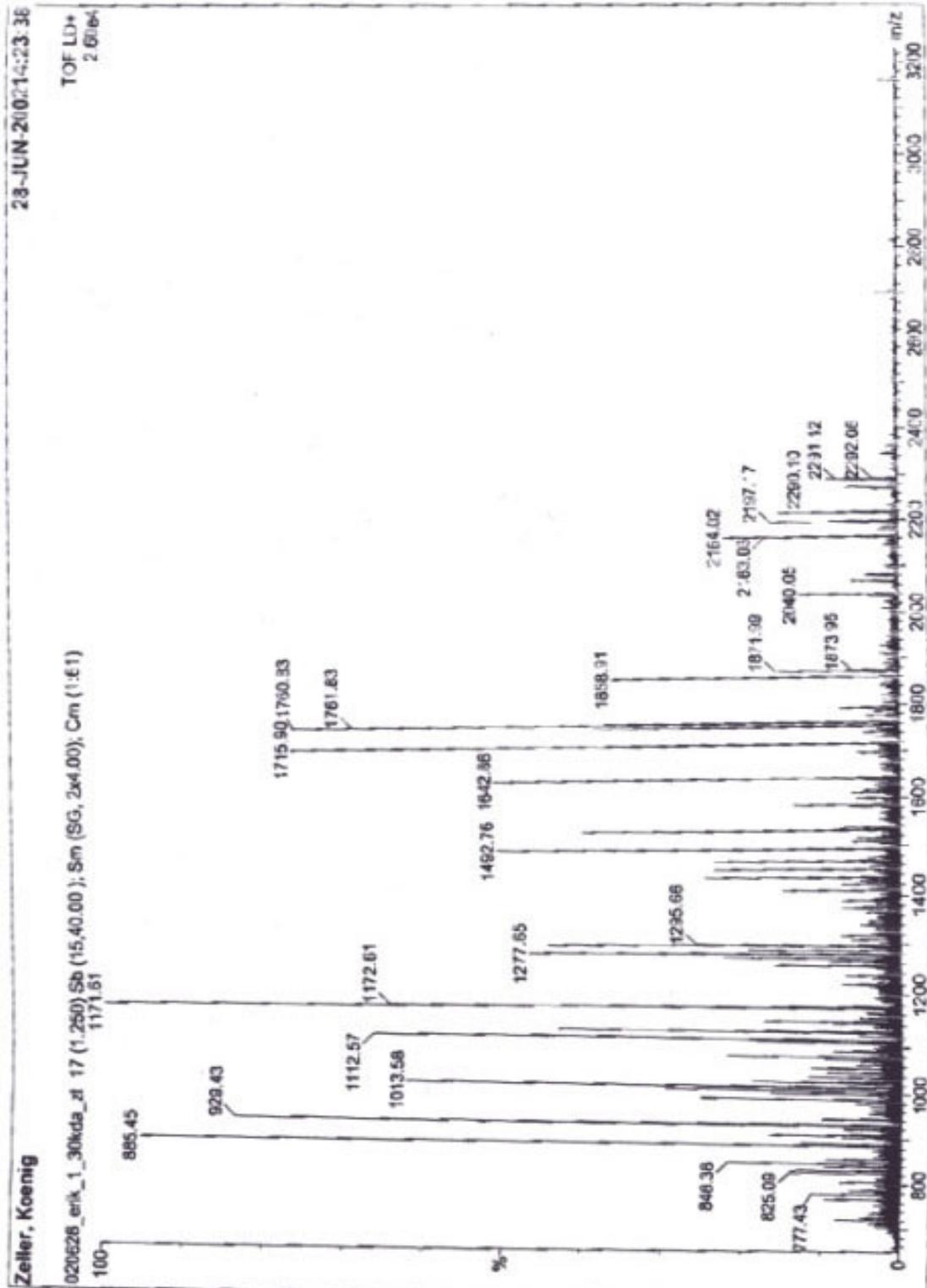


Abb. 32 Spektrum 1

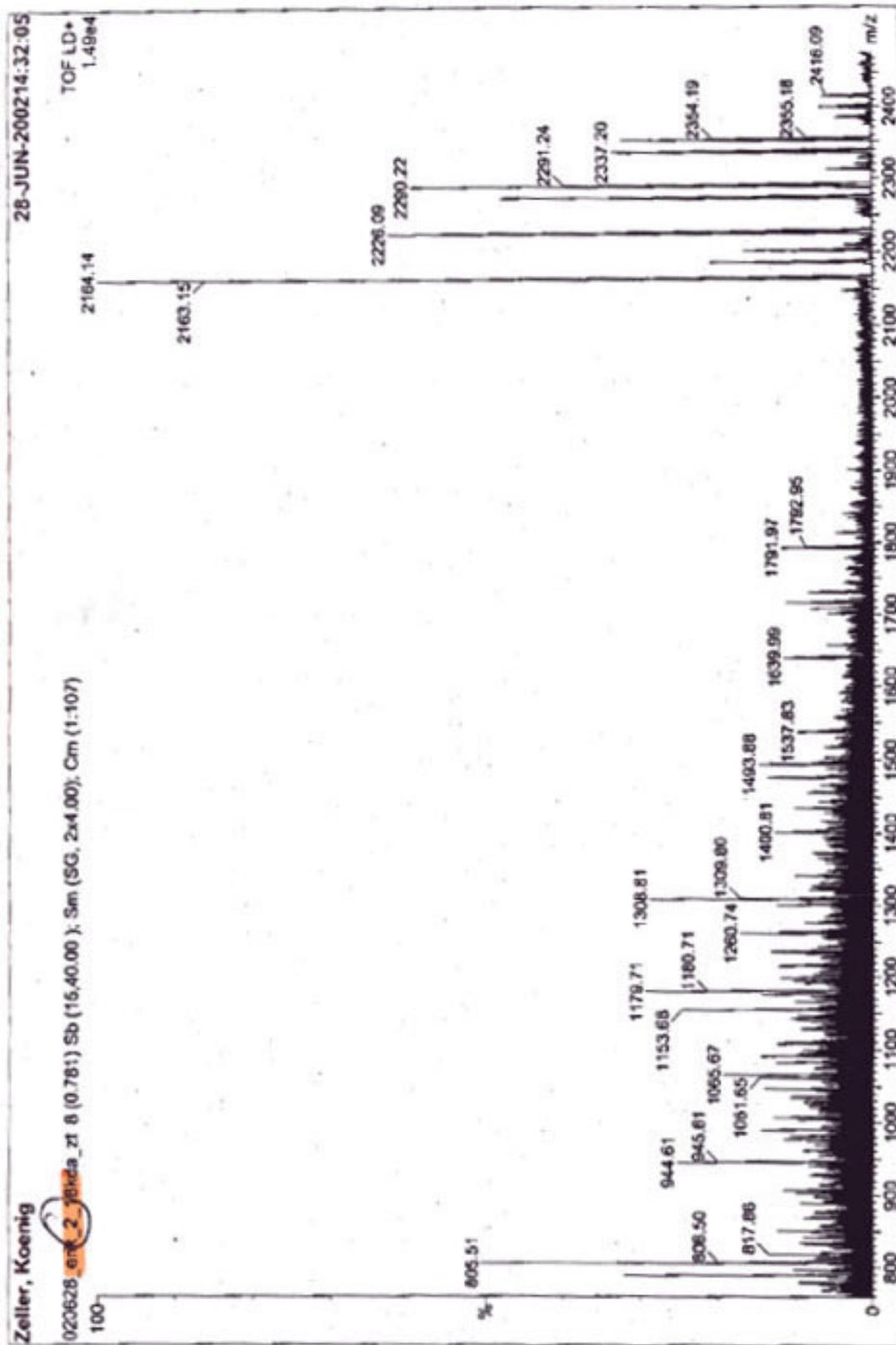


Abb. 33 Spektrum 2

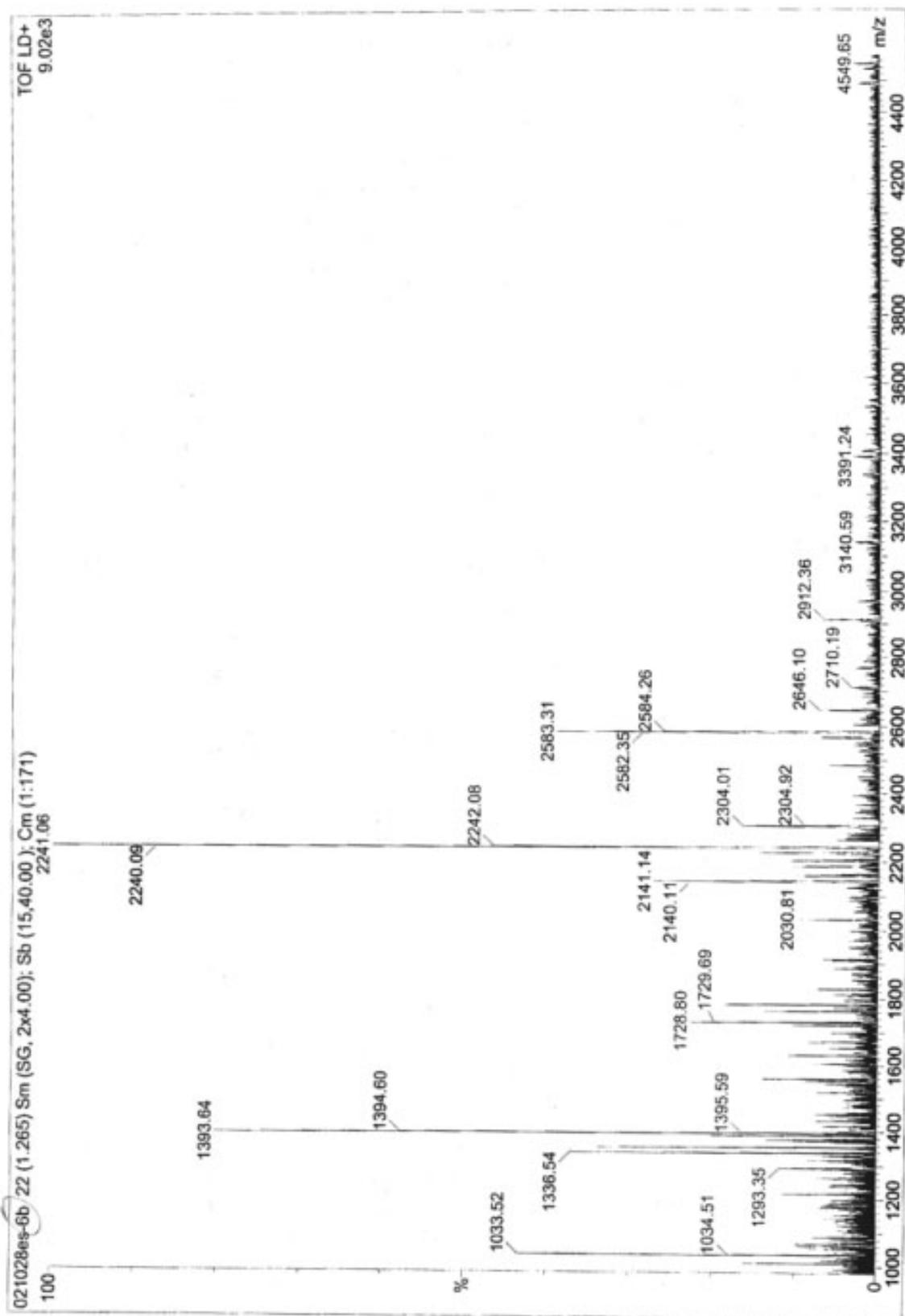


Abb. 34 Spektrum 3

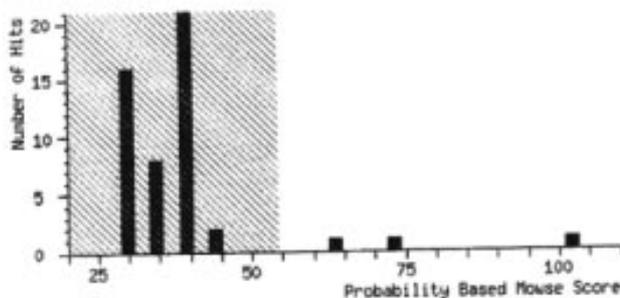
7.2. Trefferlisten

[MATRIX]
[SCIENCE] **Mascot Search Results**

User : koenig
 Email : koenigs@uni-muenster.de
 Search title : erik 1 st
 Database : NCBI nr 20020621 (1013360 sequences; 319978738 residues)
 Taxonomy : Rattus (12669 sequences)
 Timestamp : 28 Jun 2002 at 13:11:20 GMT
 Top Score : 102 for gi|6681035, (NM_007773) crystallin, beta B2; betaB2-cr

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 54 are significant ($p < 0.05$).

**Protein Summary Report**

[Switch to Concise Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Protein Summary Report \(erik 1 st\)](#)

Index

	Accession	Mass	Score	Description
→ 1.	gi 6681035	23366	102	(NM_007773) crystallin, beta B2; betaB2-cr
2.	gi 117463	21075	72	GAMMA CRYSTALLIN B (1-2)
3.	gi 3891675	20114	64	Chain A, Circularly Permuted Bb2 - Crystal
4.	gi 3293328	11022	45	(AF057979) MHC class Ib antigen [Rattus no
5.	gi 3293326	11021	45	(AF057978) MHC class Ib antigen [Rattus no
6.	gi 6981244	224897	41	(NM_012984) myosin IXb; Unconventional myo
7.	gi 8393817	213587	40	(NM_017083) myosin Vb; Myosin of the dilut
8.	gi 17380501	284462	40	Spectrin alpha chain, brain (Spectrin, non
9.	gi 1495198	284420	40	(X90845) alphaII spectrin [Rattus norvegic
10.	gi 7441355	93950	40	spectrin alpha II chain - rat (fragment)

Results List

1. [gi|6681035](#) Mass: 23366 Score: 102
 (NM_007773) crystallin, beta B2; betaB2-crystallin [Mus musculus]
 Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Start End Miss Peptide

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl.../FsEtmnE.dat&REPTYPE=protei 28.06.2002

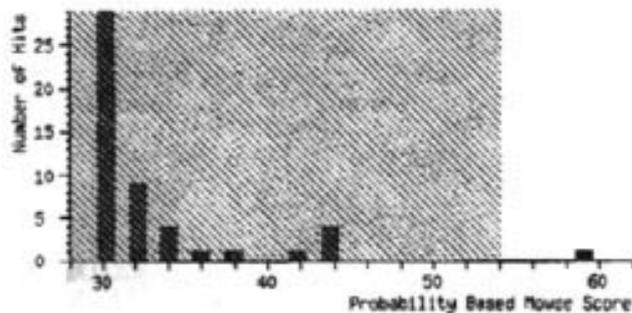
Abb. 35 Trefferliste zu Spektrum 1

{MATRIX} Mascot Search Results

User : koenig
 Email : koenigs@uni-muenster.de
 Search title : erik 2 st
 Database : NCBI nr 20020621 (1013360 sequences; 319978738 residues)
 Taxonomy : Rattus (12659 sequences)
 Timestamp : 28 Jun 2002 at 13:22:39 GMT
 Top Score : 59 for gi|12621106. (NM_022940) PAPIN [Rattus norvegicus]

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 54 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

[Switch to Concise Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Protein Summary Report \(erik 2 st\)](#)

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 12621106	293709	59	(NM_022940) PAPIN [Rattus norvegicus]
2.	gi 18959218	21974	43	(NM_133285) H1 histone family, member 4 [R
3.	gi 92378	21832	43	histone H1d - rat
4.	gi 632169	46777	43	p54-gamma stress-activated protein kinases
5.	gi 1346137	46777	43	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 8 (STRESS
6.	gi 13924282	37817	42	(NM_133585) RN protein [Rattus norvegicus]
7.	gi 1111784	8895	38	histone H1.d, hepatic - rat (fragments)
8.	gi 253346	9894	37	histone H1d subtype [rats, liver, Peptide
9.	gi 2674185	18740	34	(AF035954) kinesin-related protein KRP5 [R
10.	gi 1111428	27207	34	C/EBP-related protein CRP1 - rat (fragment
11.	gi 8391090	30571	34	(NM_017095) CCAAT / enhancer binding prote
12.	gi 5381430	65008	34	(AF159048) SPANK-3 [Rattus norvegicus]
13.	gi 11067431	47218	33	(NM_021696) plasminogen activator inhibito
14.	gi 16924020	76032	33	(NM_057155) X-prolyl aminopeptidase (amino
15.	gi 14150695	46651	32	(AF373289) protein kinase C-binding protei
16.	gi 16758204	46577	32	(NM_053460) protein that interacts with C
17.	gi 202887	167019	32	(M77183) alpha-1-macroglobulin [Rattus nor

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?_FsEtmzs.dat&REPTYPE=protei 28.06.2002
 E-mail: tomas.bergmann@mbp.kit.se

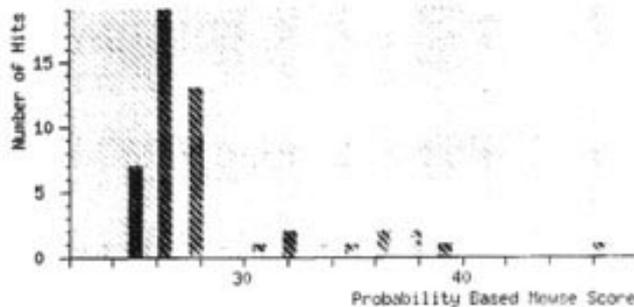
Abb. 36 Trefferliste zu Spektrum 2

(MATRIX) Mascot Search Results *(SCIENCE)*

User : Koenig
 Email :
 Search title : es 6b
 Database : NCBI nr 20020813 (1030782 sequences; 325995351 residues)
 Taxonomy : Rattus (12400 sequences)
 Timestamp : 29 Oct 2002 at 16:24:50 GMT
 Top Score : 46 for gi|11136027, Zinc finger protein 37 (Zfp-37)

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 53 are significant ($p < 0.05$).



Protein Summary Report

[Switch to Concise Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Protein Summary Report \(cs 6b\)](#)

[Re-Search All](#)

[Search Unmatched](#)

Index

	Accession	Mass	Score	Description
→	1. gi 11136027	68055	46	Zinc finger protein 37 (Zfp-37)
	2. gi 7767102	30977	39	Chain B, Crystal Structure Of The Neuronal
	3. gi 207127	32673	37	(M95734) syntaxin A [Rattus norvegicus]
	4. gi 417842	33047	37	Syntaxin 1A (Synaptotagmin associated 35 k
	5. gi 206872	28910	37	(M34728) sterol carrier protein-2 (SCP-2)
	6. gi 285304	33968	37	neuronal cell membrane antigen HPC-1 - rat
	7. gi 56772	15288	35	(X60654) non-specific lipid transfer prote
	8. gi 19424282	37817	34	(NM_133585) RN protein [Rattus norvegicus]
	9. gi 6981592	87983	32	(NM_012747) signal transducer and activato
	10. gi 18041977	42987	32	(AF388527) hypothetical RNA binding protei
	11. gi 13592152	25664	30	(NM_031154) glutathione S-transferase, mu
	12. gi 2119386	113235	28	apolipoprotein B - rat (fragment)
	13. gi 15554308	60908	28	(AY044832) glutamate transporter 1 variant
	14. gi 703261	55661	28	(J02852) cytochrome P450 IIA3 [Rattus norv
	15. gi 16758268	48561	28	(NM_053508) tektin 1 [Rattus norvegicus]
	16. gi 18677745	27133	28	(NM_130817) fibroblast growth factor 3 [Ra

Abb. 37 Trefferliste zu Spektrum 3

8. Danksagung

Für das Gelingen dieser Dissertation und eine sehr angenehme Zeit bedanke ich mich recht herzlich bei...

... *Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos*, Leiter der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie der Universität Münster, für die stets hervorragende Betreuung dieser Arbeit sowie die ständig offene Tür. Insbesondere danke ich ihm für die Überlassung großzügiger experimenteller Freiräume sowie die faszinierenden Einblicke in die experimentelle Medizin und Chirurgie. Sein wissenschaftlicher Sachverstand und Ideenreichtum haben mich immer wieder beeindruckt. Ferner finanzierte er diese Dissertation aus Drittmitteln.

... *Herrn Prof. Dr. Klaus Kuschinsky*, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, für die Übernahme des Erstgutachtens und den dadurch bedingten organisatorischen und administrativen Aufwand.

... *Herrn PD Dr. Peter Heiduschka* für die exzellente Einführung in operative Techniken sowie die Unterstützung bei der Beseitigung Computer-assoziierten Probleme.

... *Frau Karin Rose* für die Einführung in die unergründlichen Tiefen der 2D-Elektrophorese sowie die darüber hinausgehende ideelle Unterstützung.

... *Frau Dr. Rita Naskar* für die Unterstützung im linguistischen Bereich und die kritische Durchsicht von Manuskripten.

... *Frau Dr. Simone König und Kollegen*, Integrierte funktionelle Genomik, für die Durchführung und Auswertung von MALDI-TOF-MS-Analysen.

... *Frau Mechthild Langkamp-Flock, Frau Mechthild Wissing und Frau Ilka Roman* für die stets umsichtige und zuverlässige technische Unterstützung.

... *Frau Marlies Wagner und Frau Susanne von der Heide* für die exzellente und schnelle Ausführung aller Photoarbeiten.

... *Herrn Dr. Dietmar Fischer* für die wissenschaftlich-methodische Einführung zu Beginn dieser Dissertation.

... *Frau Magdalena Pinheiro* für die zuverlässige Unterstützung in der Textverarbeitung sowie das Nachsenden von vergessenen CDs.

... und nicht zuletzt *meiner Freundin Theresa* für ihre Beharrlichkeit, die Erholung an den Wochenenden und die Durchsicht des Manuskriptes; sowie *meinen Eltern* für ihre stetige und unkomplizierte Hilfe bei meinen beruflich bedingten Umzügen der letzten Jahre.

9. Publikationen

Originalartikel

Schuetz, E.; Rose, K. and Thanos, S. Regeneration of ganglion cell axons into a peripheral nerve graft alters retinal expression of glial markers and decreases vulnerability to re-axotomy. *Restor. Neurol. Neurosci.* (2003), im Druck

Übersichtsartikel

Schuetz, E. and Thanos, S. Reparatur für das ZNS – Bypässe, Stammzellen oder Neurochips – Gratwanderung zwischen Wunsch und Machbarkeit. *Neuroforum* 1 (2002) 155-161

Schuetz, E. and Thanos, S. Neurale Transplantation zur Restauration ausgefallener Nervenfunktion – physiologische Grundlagen und klinische Anwendungen. *Med. Monatsschr. Pharm.* (2003), im Druck

Abstracts

Schuetz, E. and Thanos, S: (2002) Does a peripheral nerve graft “peripherize” central neurons? *Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando/FL (USA)*

10. Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Erik Schütz
	Geburtstag:	14.12.1973
	Geburtsort:	Marburg
	Anschrift:	Potstiege 3, 48161 Münster
	Telefon:	0251-5348834
	e-mail:	eschuetz@uni-muenster.de
Schulbildung	06/80-06/84	Gundschule Rauschenberg
	06/84-06/93	Gymnasium, Gesamtschule Kirchhain
	06/93	Abitur
Wehrdienst	07/93-06/94	Montabaur (Rheinland-Pf.), Neustadt (Hess.)
Studium	10/94-10/98	Pharmazie, Philipps-Universität Marburg
	11/99	Abschluß des Staatsexamens und Approbation zum Apotheker
Berufserfahrung und Praktika	11/98-04/99	Pharmaziepraktikum, Platanenapotheke München
	05/99-10/99	Pharmaziepraktikum, Bayer AG, Wuppertal, Institut für Herz-Kreislauf-Forschung
	01/00-04/00	Auslandspraktikum, Bayer Corporation, West Haven (CT), USA, Dept. of Pharmacokinetics and Drug Metabolism
	06/00-heute	Promotion/Wissenschaftlicher Mitarbeiter Universitätsaugenklinik Münster, Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie
	03/03	Abgabe der Dissertation